

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln (Dirigierende Ärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll)

**DER EINFLUSS VON 5-FLUORURACIL
AUF MENSCHLICHES KNOCHENMARK
IN VITRO**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt H.-D. Kaspar
aus Breslau

1976

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln (Dirigierende Ärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll)

DER EINFLUSS VON 5-FLUORURACIL AUF MENSCHLICHES KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt H.-D. Kaspar
aus Breslau

Referent: Professor Dr. med. Irene B o l l

Korreferent: Professor Dr. Dr. Dieter HERRMANN

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund-
und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 4. 11. 1976

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

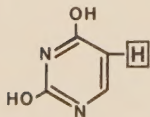
	Seite
I. Einleitung	4
II. Methode	8
III. Ergebnisse	11
A. Differentialzählungen	11
B. Zusammenfassung der Ergebnisse	27
C. Signifikanzberechnung	30
IV. Diskussion	38
V. Zusammenfassung	43
VI. Abbildungen	44
VII. Literaturverzeichnis	62

I. EINLEITUNG

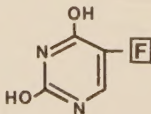
Das Zytostatikum 5-Fluor-uracil wurde 1957 in enger Zusammenarbeit von HEIDELBERGER (Mc Ardle Memorial Laboratory, Madison Wisconsin) und DUSCHINSKY von den Hoffmann-La-Roche-Laboratorien (Nutley, N.J., USA) entwickelt.

5-Fluor-uracil gehört zur Gruppe der Antimetaboliten. Es handelt sich dabei um Analoge von Nukleinsäurebestandteilen, beziehungsweise von zu deren Synthese notwendigen Bausteinen oder Fermenten. Als metabolische Antagonisten vermögen sie auf Grund ihrer chemischen Ähnlichkeit mit essentiellen Metaboliten des Nukleinsäurestoffwechsels deren Stelle im Zellstoffwechsel einzunehmen. Sie werden statt des normalen Intermediärproduktes in der Zelle umgesetzt. Die Folge ist eine Blockierung bestimmter Reaktionsvorgänge.

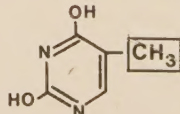
5-Fluor-uracil ist ein Pyrimidinderivat. Im Unterschied zum natürlich vorkommenden Uracil ist ein H-Atom in 5-Stellung durch Fluor substituiert.



URACIL

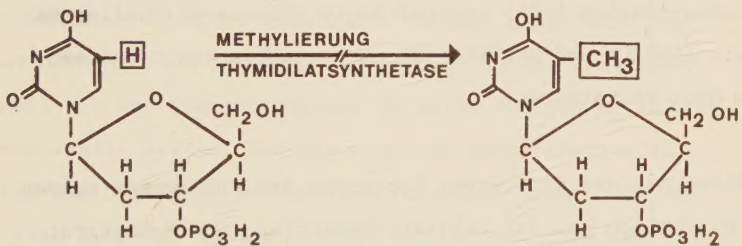


5-FLUOR-URACIL



THYMIN

Da die Methylgruppe von Thymin dieselbe Stellung einnimmt, wurden Untersuchungen angestellt, inwieweit 5-Fluor-uracil die Bildung von Thymin verhindern könne. Wie HEIDELBERGER (26), SCHMIDT (44), HARBERS et al. (24) nachweisen konnten, hat das Medikament tatsächlich diese Eigenschaft. Es wird in 5-Fluordesoxyuridin-monophosphat umgewandelt und blockiert auf dieser Stufe die Methylierung bei der Thyminbildung durch spezifische Hemmung der Thymidilatsynthetase.



DESOXYURIDYLSÄURE

THYMIDYLSÄURE

Die Folge ist eine starke Hemmung der DNS-Synthese mit anschließender Verminderung der Mitoserate.

Darüber hinaus hat 5-Fluor-uracil noch einen anderen Angriffspunkt. Da es die Methylierung zu Thymidinmonophosphat und deren Einbau in die DNS verhindert, wird es bis

zur Triphosphatstufe phosphoryliert und in die RNS eingebaut. Es entsteht eine fehlerhafte RNS (11, 15, 44).

Bevor die klinische Erprobung von 5-Fluor-uracil begann, wurde die Wirkung des Pharmakons im Tierversuch getestet. HEIDELBERGER et al. (28, 29, 30) stellten an Mäusen beim Ehrlich-Karzinom (Aszitesform), beim 755-Adenokarzinom der Mamma und beim Yoshida-Tumor (Aszitesform) eine ausgeprägte karzinostatische Wirkung fest. Deutliche Wachstumshemmungen konnte BOLLAG (10) an transplantablen Tumoren der Maus (Crocker-Sarkom S180) und der Ratte (Uterus-Epitheliom T8) sowie ALDRICH und STEVENS (2) an implantierten Teratomen der Maus feststellen.

Erfolge bei der klinischen Erprobung des Präparates werden hauptsächlich bei der Palliativbehandlung von Mammakarzinomen (1, 3, 12, 36, 47) und Rectum- und Koloncarzinomen (38, 42, 52, 53) beschrieben. Aber auch bei der Behandlung von Tumoren der Blase (17, 22, 27), des Ovar (16, 34), des Uterus (34, 35, 43, 48), des Magens (19, 25, 32, 55), des Pankreas (35), der Leber (38, 43) und bei Tumoren im Hals- und Kopfbereich (50, 51) soll 5-Fluor-uracil eine deutliche tumorhemmende Wirkung zeigen.

Aber nicht nur die Therapie mit 5-Fluor-uracil allein ist erprobt worden, sondern auch die gleichzeitige Chemo- und

Strahlentherapie (18, 19, 23, 33) und die Kombinationsbehandlung mit anderen Zytostatika (2, 8, 13).

Beim Menschen verursacht 5-Fluor-uracil eindeutige Nebenwirkungen wie Nausea, Erbrechen, Diarrhoe, Stomatitis, Hyperpigmentation, Alopecie, und auch die Hämatopoese kann schwer geschädigt werden (10, 30, 41, 54, 56).

In der vorliegenden Arbeit soll die direkte Wirkung von 5-Fluor-uracil auf die Wachstumsleistung des menschlichen Knochenmarks *in vitro* untersucht werden. Dabei wird die Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. In Tierversuchen konnte mit den Konzentrationen 10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt werden, daß die niedrige Konzentration *in vitro* die DNS-Synthese deutlich schwächer beeinflußt und *in vivo* eine nur mäßige Wirkung auf das Wachstum des Jensen-Sarkoms hat. Die Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ dagegen übte unter den gleichen Versuchsbedingungen einen wesentlich deutlicheren Effekt aus. (46)

Die Auswertung der Versuche erfolgt durch Differentialzählungen der Zellen und Mitosen von Ausstrichen aus Knochenmarkkulturen bis zu drei Tagen. Daraus wurden Reifungskurven und karyologische Kurven hergestellt und die roten und weißen Mitoseindices und die G/E-Indices berechnet. Diese Parameter wurden zur Beurteilung der Proliferation herangezogen und im Vergleich zu Parallelkulturen ohne FU-Zusatz auf Signifikanz berechnet.

II. METHODE

Von dem durch Sternalpunktion gewonnenen Knochenmark wurden Originalausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Das restliche Knochenmarkmaterial wurde nach der Carellschen Methode, modifiziert nach BOLL, auf einen koagulierten Tropfen gesetzt, der zu 50% aus autologem Nativplasma, 40% autologem Serum und 10% Embryonalextrakt(Corhormon^R), dreifach verstärkt, bestand.

Die Hälfte des Mediums blieb ohne Zusatz, die andere Hälfte wurde durch Zugabe von 5-Fluor-uracil auf eine Konzentration von 100 µg/ml gebracht.

Auf Objektträger wurde nun ein Tropfen des Mediums ohne Zusatz bzw. ein Tropfen des Mediums mit Zusatz gegeben, der nach kurzer Zeit ein Koagulum bildete. Auf diese Koagula wurden Knochenmarkbröckchen gesetzt und mit Serum, bzw. solchem, das dieselbe Fluor-uracil-Konzentration enthielt, überschichtet. Nachdem die Kulturen mit Hohlschliffobjektträgern abgedeckt und durch Hartparaffin luftdicht abgeschlossen waren, wurden sie umgedreht, so daß Kulturen am hängenden Tropfen entstanden.

Diese Kulturen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden Kulturzeit wurden Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt.

Pro Patient wurden 7 Präparate ausgewertet: ein Original, drei Kontrollen und drei Präparate mit 5-Fluor-uracil-Zusatz. Bei der mäanderförmigen Zählung der Zellen wurden die Randgebiete der Präparate bevorzugt durchmustert.

Aus jedem Präparat wurden 2000 Zellen einschließlich der Mitosen und zweikernigen Zellen nach BOLL differenziert. Insgesamt wurden 70 000 Zellen gezählt und die Ergebnisse mit Hilfe des χ^2 -Verfahrens nach HELMERT PEARSON auf Signifikanz berechnet.

Nach der Differentialzählung wurden die relativen Zellzusammensetzungen der Zellklassen innerhalb der Granulopoese und der Erythropoese bestimmt, die Abweichungen während der Kulturzeit von 24, 48 und 72 Stunden ermittelt und graphisch in Reifungskurven dargestellt. Ferner wurde für jede Kultur der G/E-Index errechnet. Hierbei handelt es sich um den Quotienten aus der Zellzahl der Granulopoese und der Erythropoese. Dieser gibt Auskunft über das quantitative Verhältnis zwischen roten und weißen Zellen in den Knochenmarkausstrichen.

Außerdem wurden der Mitoseindex für die Erythropoese (rMI) und der für die Granulopoese (wMI) getrennt bestimmt und die prozentuale Mitosephasenverteilung in caryologischen Kurven dargestellt. Der Mitoseindex ist das Verhältnis der Anzahl der Mitosen zur Zahl der teilungsfähigen Zellen. Zu den teilungsfähigen Zellen in der Erythropoese gehören sämtliche roten Zellklassen, ausgenommen die reifen Erythroblasten. Teilungsfähig in der Granulopoese sind die Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten und Metamyelocyten.

Die caryologischen Kurven stellen den prozentualen Anteil der einzelnen Mitosephasen an der Gesamtzahl der gezählten Mitosen dar. Dabei werden die Erythropoese und die Granulopoese getrennt dargestellt.

Die rote Reihe wurde differenziert in:

Proerythroblasten (PE)
basophile Erythroblasten (bE)
polychromatische Erythroblasten (pE)
oxyphile Erythroblasten (oE)
reife Erythroblasten (rE)

Die weiße Reihe wurde differenziert in:

Myeloblasten (MB)
Promyelocyten (PM)
neutrophile Myelocyten (MC)
eosinophile Myelocyten (eMC)
basophile Myelocyten (bMC)
Promonocyten (PMo)
Metamyelocyten (MM)
stabkernige Granulocyten (StG)
segmentkernige Granulocyten (SG)
eosinophile segmentkernige Granulocyten (eSG)
basophile segmentkernige Granulocyten (bSG)
Monocyten (Mo)

Die einzelnen Mitosephasen wurden nach BOLL wie folgt
unterschieden:

Prophase
frühe Metaphase
späte Metaphase
Anaphase
Telophase
Rekonstruktionsphase

III. ERGEBNISSE

A. Differentialzählungen

Die Ausstriche von fünf Knochenmarkkulturen werden ausgewertet und folgende Ergebnisse beschrieben:

Klinische Befunde und Labordaten

Befundung des Sternalpunktates

Reifungskurven der Erythropoese und der Granulopoese

Signifikanzberechnungen der gefundenen Werte

G/E-Indices

Mittelwerte der Mitoseindices

Versuch I mit dem Knochenmark des Patienten Alfred P. 60 J.

Klinische Diagnose:

Lymphosarkom

Emphysebronchitis

Medikation vor dem

Perphyllon^R

Sternalpunktat:

Natulan^R

Sternalpunktat

vom 17.4.72:

Mittlere Zelldichte der Ausstriche,
mittlerer Fettgehalt.

Große Retikulumzellen normal, kleine vermehrt, phagocytierende kommen vor. Lymphocyten normal, Plasmazellen vermehrt. Normale, nicht verschobene Granulopoese, vorwiegend Myelocyten und Jugendliche. Mitosen vorhanden. Eosinophile stark vermehrt, Promonocyten und Monocyten normal. Nicht verschobene, normoblastische Erythropoese. Megacaryocyten in allen Reifungsstufen vorhanden.

<u>Differentialblutbild</u>	Hämoglobin	14,3 g%
<u>vom 17.4.72:</u>	Erythrocyten	4,45 Mill/ μ l
	Hb _E	32,0 pg
	Leukocyten	2900/ μ l
	Eosinophile	11 %
	Basophile	2 %
	Stabkernige	2 %
	Segmentkernige	33 %
	Monocyten	8 %
	Lymphocyten	44 %
	Thrombocyten	140 000/ μ l
	Anisocytose	(+)

Auswertung der Kulturen:

1. Reifungskurven (Abb. 1, Seite 45):

In der Erythropoese finden wir nach 48h im Versuch mit FU eine Rechtsverschiebung, die nach 72h in eine starke Linksverschiebung übergegangen ist.

In der Granulopoese kommt es bis zu 72h durch 5-FU zu einer signifikanten Rechtsverschiebung, das heißt, zu einer Abnahme der reifen Granuloblasten (Tab. 9, Seite 32 u. 33).

2. G/E-Index (Tab. 1, Seite 23):

Der G/E-Index ist in der Versuchskultur nach 24h und besonders nach 72h stark vermindert. Nach 48h ist er erhöht.

3. Mitoseindices (Tab. 2-5, Seite 23-26):

Nur im Originalausstrich und im 24h-Präparat der Kontrolle werden in der Erythropoese Mitosen gefunden. Zu allen anderen Versuchszeiten sind die roten Mitoseindices für Kontrolle und Zusatz gleich Null. Die weißen Mitoseindices

der Versuche sind gegenüber den Kontrollen zu allen drei Versuchszeiten erniedrigt.

Versuch II mit dem Knochenmark des Patienten Hans B. 47 J.

Klinische Diagnose:

Lymphosarkom
Ulcus Ventriculi
chronische Bronchitis

Medikation vor dem

Valium^R

Sternalpunktat:

Novalgin^R
Atropin.sulf.
Phosphalugel^R
Megacillin^R

Sternalpunktat

vom 28.3.72:

Zellreiche Ausstriche, mittlerer Fettgehalt. Große und kleine Retikulumzellen normal, phagocytierende kommen vor. Lymphocyten normal vertreten. Plasmazellen leicht vermehrt. Linksverschobene Granulopoese, vorwiegend Promyelocyten, Myelocyten und Jugendliche. Eosinophile, Promonocyten und Monocyten vermehrt. Nicht verschobene normoblastische Erythropoese. Megacaryocyten in allen Reifungsstufen vorhanden.

Differentialblutbild vom 15.3.72 und 29.3.72

	<u>15.3.72</u>	<u>29.3.72</u>
Hämoglobin	14,5 g%	13,7 g%
Erythrocyten	4,45 Mill / μ l	4,12 Mill/ μ l
Hb _E	32,6 pg	32,2 pg
Leukocyten	9000/ μ l	8000/ μ l
Basophile	-	1 %
Eosinophile	1 %	2 %
Stabkernige	6 %	7 %
Segmentkernige	65 %	61 %
Lymphocyten	21 %	25 %
Monocyten	7 %	4 %
Thrombocyten	-	165000/ μ l

Auswertung der Kulturen:

1. Reifungskurven (Abb. 2, Seite 46):

In der Erythropoese kommt es nach 24h im Versuch zu einer signifikanten Rechtsverschiebung, die nach 48h und 72h in eine leichte Linksverschiebung übergegangen ist (Tab. 13, Seite 37).

In der Granulopoese sehen wir nach 24h im FU-Versuch eine geringe Rechtsverschiebung, die nach 48h in eine leichte Linksverschiebung übergeht.

Die Unterschiede zwischen Zusatz- und Kontrollkulturen erweisen sich während der gesamten Kulturzeit als signifikant (Tab. 10, Seite 34).

Auffällig ist im Versuch die Abnahme der Promyelocyten und Zunahme der Metamyelocyten nach 48h.

2. G/E-Index (Tab. 1, Seite 23):

Der G/E-Index liegt zu allen Versuchszeiten unter den entsprechenden Kontrollwerten. Bemerkenswert ist in diesem Versuch, daß der Index in der Kontrolle über die ganze Zeit hinweg annähernd konstant bleibt. Auch bei FU-Zusatz sind die Schwankungen sehr gering.

3. Mitoseindices (Tab. 2-5, Seite 23-26):

Im 24h- und 48h-Präparat des Versuchs liegen die roten Mitoseindices auffällig unter den entsprechenden Kontrollwerten. Nach 72h werden in der Kontrolle keine Mitosen mehr gefunden, im Versuch dagegen liegt der rote Mitoseindex geringfügig höher als zu den vorangegangenen Versuchszeiten.

Der weiße Mitoseindex liegt ebenfalls im Versuch nach 24h und 48h unter den Kontrollwerten, nach 72h sind die Werte für Kontrolle und Versuch jedoch annähernd gleich.

Versuch III mit dem Knochenmark der Patientin Johanna F.

80 J.

Klinische Diagnose: Cavernöse Oberlappen Tbc rechts
Chronisch lymphatische Leukämie,
Anämie
Kompensierte Herzinsuffizienz
Chronische Harnwegsinfektion
bei Totalprolaps des Uterus

Sternalpunktat
vom 10.1.72:

Reichlich vermehrte Lymphocyten.
Lymphoblasten kommen vor. Etwas
linksverschobene, normale Granulo-
poese, vorwiegend Promyelocyten
und Myelocyten.
Verminderte normale Erythropoese.
Megacaryocyten reichlich in allen
Reifungsstufen, Mikroaryocyten
kommen vor.

Medikation vor
diesem Sternalpunktat:

Refobacin^R
Furadantin^R
Tuberculostatica in Dreierkom-
bination:
Neoteben^R, Myambutol^R, Rifambicin^R
Lanitop^R
Valium^R
Pepsaletten^R
Ferrlecit^R

Differentialblutbild
vom 18.2.72:

Hämoglobin	8,5 g%
Erythrocyten	2,84 Mill/ μ l
Hb _E	29,8 pg
Leukocyten	10 000 / μ l
Basophile	1 %
Eosinophile	2 %
Stabkernige	1 %
Segmentkernige	14 %
Lymphocyten	78 %
Monocyten	4 %
Retikulocyten	30 ‰
Anisocytose	(+)

Auswertung der Kulturen:

1. Reifungskurven (Abb. 3, Seite 47):

Die bis 48h in der Erythropoese beibehaltene mäßige Rechtsverschiebung durch FU geht nach 72h im Zusatzpräparat in eine stärkere Rechtsverschiebung über. Der Unterschied bei 24h ist signifikant (Tab. 13, Seite 37). Bei den Granuloblasten sind die Kurven nach 24h und 48h durch den Zusatz nach links verschoben, was durch die Berechnung signifikant wird. Nach 72h sind die Kurven nach rechts verschoben (Tab. 11, Seite 35).

2. G/E-Index (Tab. 1, Seite 23):

Die G/E-Indices steigen in den drei Kulturzeiten sowohl für die Kontrollen als auch für die Versuche an. Dabei liegen die Werte in den Versuchspräparaten über den entsprechenden Kontrollwerten.

3. Mitoseindices (Tab. 2-5, Seite 23-26):

Der rote Mitoseindex liegt nach 24h im Versuch nur wenig unter dem der Kontrolle, ist aber nach 48h und 72h gleich Null.

Zu allen drei Versuchszeiten sind die weißen Mitoseindices der Versuche gegenüber denen der Kontrollen erniedrigt.

Versuch IV mit dem Knochenmark der Patientin Gisela B. 42 J.

Klinische Diagnose: Anämie bei Eisenresorptionsstörung
und atrophischer Magenschleimhaut.

Medikation vor dem Agiolax^R

Sternalpunktat: Valium^R

Novalgin^R

Cytobion^R

Ferrlecit^R

Kobalt-Ferrlecit^R

Pepsaletten^R

Ulcolind^R

Sternalpunktat Zellreiche Ausstriche, mittlerer
Fettgehalt. Große und kleine
vom 2.2.72: Retikulumzellen vermehrt, phago-
cytierende kommen vor. Plasma-
zellen vermehrt, Gewebsmastzellen
kommen vor. Wenig verminderte,
nicht verschobene Granulopoese.
Promonocyten und Monocyten sind
etwas vermehrt. Stellenweise
vermehrte, etwas linksverschobene
Erythropoese. Megaloblastoide
kommen vor.
Megacaryocyten reichlich in allen
Reifestufen vorhanden, viele
zerfallende.

<u>Differentialblutbild</u>	Hämatokrit	28 %
	Hämoglobin	7,5%
<u>vom 1.2.72:</u>	Erythrocyten	2,47 Mill/ μ l
	Hb _E	30,4 pg
	Leukocyten	7000/ μ l
	Basophile	1 %
	Eosinophile	1 %
	Stabkernige	5 %
	Segmentkernige	64 %

Lymphocyten	22 %
Monocyten	7 %
Thrombocyten	300 000/ μ l
Retikulocyten	13 %
Anisocytose	(+)
Poikilocytose	(+)
Polychromasie	(+)

Auswertung der Kulturen:

1. Reifungskurven (Abb. 4, Seite 48):

In der Erythropoese kommt es durch den FU-Zusatz nach 24h zu einer signifikanten Zunahme der reifen Erythroblasten. Nach 48h und 72h haben die reifen Erythroblasten durch den Zusatz wieder etwas abgenommen (Tab. 13, Seite 37). Im 24h-Präparat des Versuchs fällt eine Zunahme der Promyelocyten auf, ohne daß dadurch das Verhältnis zwischen reifen und unreifen Zellen beeinflußt wird. Nach 48h haben die Promyelocyten so stark abgenommen, daß sie unter dem Kontrollwert liegen, bei gleichzeitiger signifikanter Linksverschiebung (Tab. 12, Seite 36). Im 72h-Präparat hat die Zahl der reifen Zellen signifikant zugenommen. Die Ursache dafür liegt in einer starken Zunahme der Monocyten auf Kosten der Metamyelocyten, Stabkernigen und Segmentkernigen und weiterer Abnahme der Promyelocyten und Myelocyten.

2. G/E-Index (Tab. 1, Seite 23):

Der G/E-Index ist nach 24h und 48h in der Versuchskultur erniedrigt, nach 72h gering erhöht.

3. Mitoseindices (Tab. 2-5, Seite 23-26):

In der Kontrolle steigen die roten Mitoseindices bis 48h stetig an. Nach 72h werden dann keine Mitosen mehr gezählt. Im Versuch liegt der rote Mitoseindex bei Zusatz von 5-FU nach 24h erheblich über dem entsprechenden Kontrollwert (4 Mitosen auf 70 teilungsfähige Erythroblasten). Bei 48h und 72h sind die Indices dann gleich Null.

Die weißen Mitoseindices bei 24h und 48h liegen in den Versuchen unter den Kontrollwerten. Nach 72h werden im Versuch keine Mitosen mehr gezählt.

Versuch V mit dem Knochenmark der Patientin Minna L. 80 J.

<u>Klinische Diagnose:</u>	Morbus Hodgkin Dekompensierte Herzinsuffizienz
<u>Medikation vor dem</u>	Valium ^R
<u>Sternalpunktat:</u>	Lanicor ^R Dihydergot ^R Paspertin ^R Lasix ^R
<u>Sternalpunktat</u> <u>vom 22.11.71:</u>	Zellreiche Ausstriche, mittlerer Fettgehalt. Große und kleine Retikulumzellen normal, phagocytierende kommen vor. Lymphocyten und Plasmazellen normal. Normale Granulopoese. Vorwiegend Myelocyten, Jugendliche und Stabkernige. Eosinophile, Promonocyten und Monocyten etwas vermehrt. Normale, wenig linksverschobene

Erythropoese

Reichlich Megacaryocyten in allen Reifungsstufen vorhanden.

Differentialblutbild vom 10.11.71:

Hämoglobin	12,0 g%
Erythrocyten	3,94 Mill/ μ l
Hb _E	30,6 pg
Leukocyten	7300/ μ l
Stabkernige	9 %
Segmentkernige	73 %
Lymphocyten	13 %
Monocyten	5 %
Tox Granulat	(+)
Thrombocyten	208000/ μ l
Retikulocyten	5 ‰

Auswertung der Kulturen:

1. Reifungskurven (Abb. 5, Seite 49):

Die Erythropoese zeigt nach 24h im FU-Versuch eine Rechtsverschiebung, die nach 48h in eine ebenso stark ausgeprägte Linksverschiebung übergegangen ist. Nach 72h ist die Reifung der roten Zellen dann wieder gestört. Die Granulopoese ist im Versuch nach 48h und 72h linksverschoben.

2. G/E-Index (Tab. 1, Seite 23):

Der G/E-Index ist nach 24h in der Versuchskultur erniedrigt, nach 48h und 72h erhöht.

3. Mitoseindices (Tab. 2-5, Seite 23-26):

In diesem Versuch sind die roten Mitoseindices in den Kontrollen sehr hoch. Nach 24h und 72h liegen die Indices

des Versuches unter den entsprechenden Kontrollwerten. Nur nach 48h liegt der rote Mitoseindex des Versuches mit 132,23‰ extrem hoch über dem Kontrollwert (16 Mitosen).

Der weiße Mitoseindex des 24h- und 48h-Präparates ist im Versuch gegenüber dem Kontrollwert erhöht und erst bei 72h erniedrigt.

Tabelle 1: G/E-Indices (in Promille)

Versuch	Original	24h		48h		72h	
		Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU
I	1.74	3.17	2.20	2.89	5.72	13.80	2.78
II	3,62	5.04	3.26	5.71	3.60	5.08	2.96
III	2.87	5.92	10.07	9.60	13.49	11.75	14.88
VI	2.36	5.05	2.86	3.94	2.98	6.28	6.88
V	2.13	3.58	2.41	4.16	5.82	2.84	3.49
Arithmet. Mittel	2.54	4.55	4.37	5.26	6.32	7.95	6.20

Tabelle 2: Mitoseindices der Erythropoese (in Promille)

Versuch	Original	24h		48h		72h	
		Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU
I	9.25	6.13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
II	34.78	28.30	10.25	31.25	11.36	0.0	13.50
III	20.20	11.60	10.40	0.0	0.0	19.20	0.0
IV	21.85	25.30	57.14	29.41	0.0	0.0	0.0
V	37.85	48.19	22.08	73.89	132.23	85.1	28.73
Arithmet. Mittel	24.79	23.90	19.97	26.91	28.72	20.86	8.45

Tabelle 3: Mitoseindices der Erythropoese berechnet aus
absoluten Zahlen

Erythroblasten

Versuch	Original	24h		48h		72h	
		Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU
I	432	163	184	87	92	36	21
II	345	106	195	64	88	71	74
III	345	171	96	60	55	52	43
IV	366	79	70	34	59	9	8
V	502	166	317	203	121	94	174
Summe	1990	685	862	448	415	262	320

Mitosen

I	4	1	0	0	0	0	0
II	12	3	2	2	1	0	1
III	7	2	1	0	0	1	0
IV	8	2	4	1	0	0	0
V	19	8	7	15	16	8	5
Summe	50	16	14	18	17	9	6

Arithmet.
Mittel
(in Pro-
mille)

25,12 23,35 16,24 40,17 40,96 34,35 18,75

Tabelle 4: Mitoseindices der Granulopoese (in Promille)

Versuch	Original	24h		48h		72h	
		Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU
I	9.77	7.59	1.17	22.20	7.13	14.50	8.80
II	5.38	16.61	2.60	7.40	5.22	2.66	2.17
III	5.00	19.70	5.80	9.30	2.00	13.40	3.60
IV	5.17	14.66	2.74	8.71	4.07	12.88	0.0
V	19.35	9.39	11.24	7.22	14.60	10.70	3.95
Arithmet. Mittel	8.93	13.59	4.71	10.97	6.60	10.83	3.70

Tabelle 5: Mitoseindices der einzelnen Reifestadien
(in Promille)

Erythropoese

Zelltyp	Original	24h		48h		72h	
		Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU
PE	28.03	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
bE	34.86	15.39	28.57	0.0	88.89	40.0	0.0
pE	23.29	42.68	19.69	65.22	58.51	66.12	41.67
oE	14.71	0.0	9.26	18.41	5.22	0.0	5.41

Granulopoese

Zelltyp	Original	24h		48h		72h	
		Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU	Kontr.	5-FU
MB	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PM	9.12	17.00	4.40	10.70	5.31	11.60	5.49
MC	13.79	16.93	9.88	12.36	11.56	13.10	9.21
eMC	35.08	8.26	3.75	24.46	2.94	7.51	0.0
bMC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	28.98	0.0
PMo	14.56	11.87	2.73	15.83	13.82	9.17	2.5

B. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Mittelwertkurve der Reifungskurven aus allen fünf Versuchen (Abb. 6) zeigt nach 24h in der Erythropoese eine mäßige Reifungshemmung. Bei 48h und bei 72h zeigt hier 5-FU keinen Einfluß auf die Reifung.

Die Granulopoese ist nach 24h nicht beeinflusst. Nach 48h liegt eine Reifungsförderung vor, die nach 72h ausgeglichen ist.

Der G/E-Index (Abb. 8, Tab. 1) wird bis 24h nicht beeinflusst. Nach 24h haben im Versuch die weißen Zellen relativ zur Anzahl der roten Zellen zugenommen, ausgedrückt durch einen Anstieg des G/E-Index. Nach 72h liegt der Index dann eindeutig unter dem der Kontrolle.

Der Mitoseindex (Abb. 9, Tab. 2, 3) wird in der Erythropoese durch den Zusatz nach 24h erniedrigt, und der Mitoseindex der polychromatischen Erythroblasten ist zu dieser Versuchszeit besonders deutlich erniedrigt (Tab. 5, Seite 26). Nach 48h ist der rote Mitoseindex leicht erhöht, wobei die Mitosen der basophilen Erythroblasten im Versuchspräparat besonders vermehrt sind (Tab. 5). Nach 72h ist der Mitoseindex durch den Zusatz gesunken.

Der Mitoseindex der Granulopoese ist während der gesamten Versuche durch den Zusatz signifikant erniedrigt (Abb. 9, Tab. 6-8). Am auffälligsten ist die Verminderung der eosinophilen Myelocytenmitosen bei 48h und die vielen basophilen Myelocytenmitosen bei 72h in der Kontrolle (Tab. 3, 5).

Die caryologische Kurve der Erythropoese (Abb. 10) zeigt nur eine geringe Beeinflussung durch das Medikament, wobei die Prophasen leicht vermehrt und die Anaphasen und Telophasen vermindert sind. In der Granulopoese sind ebenfalls durch den Zusatz die Prophasen etwas vermehrt. Hier sind die späten Metaphasen gering vermindert.

Die Lymphocytopoese (Abb. 11) ist bei den Mittelwertkurven aus fünf Versuchen nur bei 24h und 48h beeinflusst. Bei 24h bewirkt 5-FU eine Vermehrung und bei 48h eine Verminderung der Lymphocytenzahl.

Die Herausnahme des Versuches III (Johanna F.), bei dem wegen CLL eine große Lymphocytenzahl vorliegt, bringt keine Änderung des Ergebnisses nach 24h und 48h (Abb. 12). Nach 72h ist die Lymphocytenzahl durch den Zusatz erniedrigt. Die wenigen Lymphoblasten (Abb. 11, 12) zeigen bei beiden Untersuchungen keine Beeinflussung durch das Medikament.

Sowohl bei den großen-, den kleinen- als auch den phagocytierenden Retikulumzellen (Abb. 13) ist bis 24h keine Beeinflussung durch 5-FU sichtbar. Die großen Retikulumzellen nehmen nach 48h ab, nach 72h sind sie gegenüber den entsprechenden Kontrollwerten vermehrt. Bei den kleinen Retikulumzellen kommt es nach 48h und mehr noch nach 72h zu einer Zunahme der Zellen. Bei Herausnahme des Versuches III (Johanna F.), bei dem eine gegenüber den anderen Versuchen erhöhte Retikulumzellzahl vorliegt, ändert sich der Kurvenverlauf nicht (Abb. 14). Die phagocytierenden Retikulumzellen sind durch den Zusatz bei 48h und 72h vermindert.

Die Plasmazellen sind durch das Medikament bis 48h nicht beeinflusst, nach 72h erfolgt eine Erhöhung der Zellzahl über den Kontrollwert (Abb. 15).

Die zweikernigen Zellen sind durch den Zusatz bis 24h nicht beeinflusst. Nach 48h sind sie leicht vermindert, nach 72h vermehrt (Abb. 16). In der Erythropoese (Abb. 17) nimmt die Zahl der zweikernigen Zellen nach 48h und 72h zu. In der Granulopoese nimmt die Zahl der zweikernigen Zellen nach 48h ab und bei 72h zu (Abb. 17).

Da durch 5-FU nach 24h die zweikernigen Zellen sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulopoese vermindert sind, in Abbildung 16 jedoch keine Abweichung vorhanden ist, müssen durch den Zusatz die zweikernigen Plasma- und Retikulumzellen vermehrt sein.

Bei der morphologischen Differenzierung ist für die Versuchszeiten 24h und 48h kein Unterschied zwischen den Kontrollen und Versuchen festzustellen. Auch die Mitosephasen sind gut zu differenzieren. Nach 72h sind vereinzelt in manchen Versuchs- sowie Kontrollpräparaten Zellen mit pyknotischen Kernen und vakuolisiertem Zellplasma zu finden.

C. Signifikanzberechnung

Die Ergebnisse aus Versuchsreihe und Kontrollreihe und die Abweichungen der weißen Mitoseindices unter dem Einfluß von 5-FU prüfen wir nach dem χ^2 -Verfahren auf Signifikanz.

In der Formel

$$\chi^2_{mf} = \sum \frac{(p-q)^2}{q}$$

bedeuten:

mf = Anzahl der Freiheitsgrade

p = Beobachtungswert

q = Erwartungswert

Für eine Signifikanzberechnung der weißen Mitoseindices werden die Mitosen aller Granuloblasten summiert (Tab. 6-8). Die Signifikanzberechnung der Reifungskurven erfolgt für jeden Versuch getrennt (Tab. 9-13).

Für jeden errechneten χ^2 -Wert läßt sich eine Wahrscheinlichkeit p (eng. probability) errechnen. Dieser Wert p wird aus einer logarithmischen Kurve unter Berücksichtigung der entsprechenden Freiheitsgrade abgelesen. Ist p gleich 0,05 oder kleiner, so ist die Abweichung signifikant. Ist p größer als 0,05, so ist die Abweichung zufallsbedingt.

Eine ausführliche Erläuterung des χ^2 -Verfahrens findet man bei BELITZ (6).

Tabelle 6: Werte der Signifikanzberechnung für den wMI zur Zeit 24h und den Zusatz von 100 µg/ml FU aus allen 5 Versuchen

p	p _{Kontr.}	q	p-q	(p-q) ²	(p-q) ² /q
70	69,5	48,46	21,04	442,68	9,135
5026	5026,5	5047,54	-21,04	442,68	0,088
20	20,5	41,53	-21,03	442,26	10,649
4347	4346,5	4325,47	21,03	442,26	0,102
					$\chi^2 = 19,974$
					p = 0,00001 x)

Tabelle 7: Werte der Signifikanzberechnung für den wMI zur Zeit 48h und den Zusatz von 100 µg/ml FU aus allen 5 Versuchen

p	p _{Kontr.}	q	p-q	(p-q) ²	(p-q) ² /q
46	45,5	36,48	9,02	81,36	2,230
4114	4114,5	4123,52	-9,02	81,36	0,020
26	26,5	35,52	-9,02	81,36	2,291
4024	4023,5	4014,48	9,02	81,36	0,020
					$\chi^2 = 4,561$
					p = 0,035 x)

Tabelle 8: Werte der Signifikanzberechnung für den wMI zur Zeit 72h und den Zusatz von 100 µg/ml FU aus allen 5 Versuchen

p	p _{Kontr.}	q	p-q	(p-q) ²	(p-q) ² /q
43	42,5	32,27	10,23	104,65	3,243
4084	4084,5	4094,73	-10,23	104,65	0,026
15	15,5	25,73	-10,23	104,65	4,067
3275	3274,5	3264,27	10,23	104,65	0,032
					$\chi^2 = 7,368$
					p = 0,0065 x)

x) signifikant

Tabelle 9: Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Granulopoese

Versuch I: 100 µg/ml 5-Fluor-uracil nach 24 Stunden

Zelltyp	P _{Kontrolle}	q _{Kontrolle}	$(p_K - q_K)^2 / q_K$
MB	0	0	0,0
PM	554	543,2899	0,2111
MC	151	196,0924	10,3692
eMC	118	102,5568	2,3254
PMo	114	89,4998	6,7068
MM	116	136,8611	3,1797
StG	24	23,6213	0,0060
SG	60	42,2572	7,4497
eSG	15	8,9025	4,1762
Mo	35	40,4767	0,7410
Zelltyp	P _{Zusatz}	q _{Zusatz}	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
MB	0	0	0,0
PM	410	420,6263	0,2684
MC	197	151,8188	13,4459
eMC	64	79,4016	2,9874
PMo	45	69,2926	8,5164
MM	127	105,9607	4,1775
StG	18	18,2881	0,0045
SG	15	32,7164	9,5936
eSG	1	6,8925	5,0375
Mo	37	31,3379	1,0230
			$\chi^2 = 80,2193$
			$p = 10^{-10}$ (signifikant)
100 µg/ml 5-Fluor-uracil nach 48 Stunden			
Zelltyp	P _{Kontrolle}	q _{Kontrolle}	$(p_K - q_K)^2 / q_K$
MB	0	0	0,0
PM	658	613,4720	3,2320
MC	65	77,1885	1,9246
eMC	114	107,5594	0,3856
PMo	65	85,7650	5,0275
MM	37	48,1293	2,5735
StG	15	17,6575	0,3999
SG	41	40,3600	0,0101
eSG	3	4,0360	0,2659
Mo	7	9,0810	0,4768
Zelltyp	P _{Zusatz}	q _{Zusatz}	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
MB	0	0	0,0
PM	693	737,5040	2,6855
MC	105	92,7945	1,6054
eMC	123	129,3058	0,3075
PMo	124	103,1050	4,2345
MM	69	57,8601	2,1447
StG	24	21,2275	0,3621
SG	48	48,5200	0,0055
eSG	6	4,8520	0,2716
Mo	13	10,9170	0,3974
			$\chi^2 = 26,3101$
			$p = 0,0015$ (signifikant)

100 µg/ml 5-Fluor-uracil nach 72 Stunden

Zelltyp	$p_{\text{Kontrolle}}$	$q_{\text{Kontrolle}}$	$(p_K - q_K)^2 / q_K$
MB	0	0	0,0
PM	1065	1050,3475	0,2044
MC	58	83,3375	7,7034
eMC	69	54,1325	4,0833
PMo	77	80,9775	0,1953
MM	35	79,7975	25,1488
StG	22	17,4050	1,2130
SG	136	93,2200	19,6323
eSG	1	0,4425	0,7023
Mo	8	7,5225	0,0303
	p_{Zusatz}	q_{Zusatz}	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
MB	0	0	0,0
PM	736	750,5534	0,2821
MC	85	59,5510	10,8755
eMC	24	38,6818	5,5725
PMo	62	57,8646	0,2955
MM	102	57,0214	35,4792
StG	8	12,4372	1,5830
SG	24	66,6128	27,2597
eSG	00	0,3162	0,3162
Mo	5	5,3754	0,0262
			$\chi^2 = 140,6030$ $p = 10^{-10}$ (signifikant)

Die folgenden Tabellen sind verkürzt wiedergegeben.

Tabelle 10: Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Granulopoese

Versuch II: 100 µg/ml 5-FU nach 24 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PM	0,0455	0,0467
MC	0,3690	0,3827
eMC	2,4175	2,7785
PMo	0,0016	0,0028
MM	1,7860	1,9848
StG	0,0653	0,0563
SG	1,3492	1,4111
eSG	4,1537	4,4407
Mo	1,9838	2,0241

$$\chi^2 = 25,2993$$

$$p = 0,002 \quad (\text{signifikant})$$

100 µg/ml 5-FU nach 48 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PM	10,3890	9,7457
MC	17,7524	16,7124
eMC	5,1158	4,7831
PMo	1,0450	0,9508
MM	16,8462	15,8285
StG	0,9083	0,8648
SG	0,6264	0,5460
eSG	0,7207	0,4749
Mo	0,5418	0,5784

$$\chi^2 = 104,4302$$

$$p = 10^{-10} \quad (\text{signifikant})$$

100 µg/ml 5-FU nach 72 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PM	0,0691	0,0788
MC	7,0171	8,2977
eMC	7,3927	8,9934
PMo	1,6333	1,9753
MM	1,3379	1,5589
StG	0,4015	0,4970
SG	1,6631	2,0198
Mo	0,0474	0,0839

$$\chi^2 = 43,0669$$

$$p = 10^{-7} \quad (\text{signifikant})$$

Tabelle 11: Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Granulopoese

Versuch III: 100 µg/ml 5-Fluor-uracil nach 24 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
MB	0,0	0,0
PM	18,2058	18,9061
MC	4,7239	4,9636
eMC	1,8060	1,8419
PMo	28,6060	30,0142
MM	1,5969	1,7205
StG	4,0185	4,1998
SG	6,8694	7,2536
eSG	4,5313	4,6559
Mo	8,1578	8,5431

$$\chi^2 = 160,6143$$

$$p = 10^{-10} \text{ (signifikant)}$$

100 µg/ml 5-Fluor-uracil nach 48 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
MB	0,0	0,0
PM	7,0997	5,7819
MC	48,1187	39,0839
eMC	3,9800	3,1598
PMo	5,9909	4,8887
MM	26,1465	21,1914
StG	2,9982	2,4416
SG	62,2033	50,7873
eSG	3,0883	2,5582
Mo	8,4378	6,9146

$$\chi^2 = 304,8708$$

$$p = 10^{-10} \text{ (signifikant)}$$

Tabelle 12: Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Granulopoese

Versuch IV: 100 µg/ml 5-FU nach 24 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PM	9,1277	13,0374
MC	16,9717	24,0698
eMC	6,1933	8,7728
PMo	1,0860	1,5060
MM	0,1695	0,2194
StG	0,1879	0,2632
SG	0,1716	0,2329
Mo	0,0140	0,0171

$$x^2 = 10^{-82,0403} \quad (\text{signifikant})$$

100 µg/ml 5-FU nach 48 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PM	4,6526	5,3785
MC	5,9728	6,9701
eMC	3,7134	4,3911
PMo	1,9532	2,3264
MM	0,3632	0,4313
StG	0,9988	1,1473
SG	2,7384	3,1283
eSG	6,8465	7,8212
Mo	0,1193	0,1418

$$x^2 = 10^{-59,0942} \quad (\text{signifikant})$$

100 µg/ml 5-FU nach 72 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PM	14,3738	17,5085
MC	14,4199	17,7093
eMC	4,5101	5,5487
PMo	2,5400	3,1124
MM	0,6884	0,8022
StG	2,6106	3,1389
SG	8,9359	10,7675
Mo	13,0082	15,9003

$$x^2 = 135,5747$$

$$p = 10^{-10} \quad (\text{signifikant})$$

Tabelle 13: Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Erythropoese

Versuch I: 100 µg/ml 5-FU nach 24 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PE	5,4251	4,8898
bE	3,6298	3,2714
pE	2,5453	2,2946
oE	0,0090	0,0081
rE	0,0107	0,0097

$\chi^2 = 22,0935$
 $p = 0,0003$ (signifikant)

Versuch II: 100 µg/ml 5-FU nach 24 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PE	1,3684	0,9722
bE	2,2807	1,6203
pE	10,8429	7,7034
oE	0,0063	0,0045
rE	2,5853	1,8368

$\chi^2 = 29,2208$
 $p = 10^{-5}$

Versuch III: 100 µg/ml 5-FU nach 24 Stunden

Zelltyp	$p_{\text{Kontrolle}}$	$q_{\text{Kontrolle}}$	$(p_K - q_K)^2 / q_K$
PE	5	4,5724	0,0399
bE	21	19,5959	0,1005
pE	94	106,4713	1,4608
oE	51	43,7643	1,1962
rE	23	19,5959	0,5913

	p_{Zusatz}	q_{Zusatz}	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PE	2	2,4276	0,0753
bE	9	10,4040	0,1894
pE	69	56,5286	2,7514
oE	16	23,2356	2,2532
rE	7	10,4040	1,1137

$\chi^2 = 9,7717$
 $p = 0,045$ (signifikant)

Versuch IV: 100 µg/ml 5-FU nach 24 Stunden

Zelltyp	$(p_K - q_K)^2 / q_K$	$(p_Z - q_Z)^2 / q_Z$
PE	0,0850	0,0684
bE	2,0670	1,6626
pE	1,2310	0,9901
oE	0,9633	0,7748
rE	1,0169	0,8179

$\chi^2 = 9,6770$
 $p = 0,045$ (signifikant)

IV. DISKUSSION

1. Konzentration

Wir verwendeten in unseren Versuchsreihen an menschlichem Knochenmark in vitro die Konzentration von 100 µg/ml Fluor-uracil. Wie SEIDEL und WEGENER feststellten, beeinflusst diese Konzentration deutlich die DNS-Synthese in vitro und das Wachstum des Jensen-Sarkoms in vivo.

2. Morphologie

Bei der Differenzierung zwischen den Zellen der Versuchspräparate und der Kontrollen ist kein Unterschied festzustellen. Die Pyknose der Zellkerne, die Vakuolisierung des Zellplasmas und die stärkere Zerstörung einzelner Zellen nach 72h entsprechen dem Kulturverlauf in vitro. Folglich kann ein toxischer Effekt bei der Konzentration von 100 µg/ml auf die Knochenmarkszellen nicht festgestellt werden.

3. Wirkung auf die Granulopoese

In der Literatur wird über eine Vielzahl klinischer Versuchsserien berichtet, bei denen Remissionen nach der Behandlung bösartiger Tumoren mit 5-Fluor-uracil auftreten. Ein limitierender Faktor für die Durchführung der Therapie ist die meist eine Minderung der Infekteresistenz nach sich ziehende Leukopenie.

Wie BOLLAG(10) feststellt, handelt es sich dabei nicht um eine Zerstörung der Granulocyten im peripheren Blut, sondern um eine Störung ihrer Bildung im Knochenmark. Bei einer Dosierung von 40 mg/kg kommt es bei Ratten in den Blutbildungs-

stätten zu einer starken quantitativen Abnahme der Blutelemente und ihrer Vorläufer. Die Granulocyten reagieren dabei mit einer wesentlich deutlicheren Verminderung auf das Medikament als die Erythrocyten, Thrombocyten und Lymphocyten. Auch REISMANN und WONG(41,56) berichten, daß es bei tierexperimentellen Versuchen zu mehr oder weniger ausgeprägten Knochenmarkdepressionen kommt. Laut HEIDELBERGER und WILMANNS betreffen diese Depressionen ebenfalls vorwiegend die Granulopoese(30,54).

ANSFIELD(4,5) stellte an einem Untersuchungsgut von 1000 Fällen bei 54% der Behandelten ein deutliches Absinken der Leukocyten im peripheren Blut fest.

In der vorliegenden Arbeit können die Ergebnisse der vorher zitierten Autoren bestätigt werden. Der G/E-Index ist durch den Zusatz nach 72h erniedrigt, was auf eine stärkere Reduzierung der Granulopoese als der Erythropoese hinweist (Abb.8).

3a. Regeneration

Wie BERGER/WITKUS(7) an Wurzelspitzen von *Allium cepa*, HEIDELBERGER(30) an der Mucosa des Jejunums und Ileums von Albinomäusen und GANZER/NITZE(20) an Plattenepithelcarcinomen von vier Patienten feststellten, bewirkt 5-Fluor-uracil auch in unseren Versuchen eine Hemmung der Zellen in die Mitose einzutreten, das heißt, der mittlere Mitoseindex wird durch den Zusatz von 5-Fluor-uracil besonders bei der Granulopoese erniedrigt(Abb.9). Diese Verminderung der Regeneration in der Granulopoese ist in allen drei Versuchszeiten hochsignifikant.

3b. Mitoseablauf

In der caryologischen Kurve (Abb. 10) ist keine wesentliche Beeinflussung durch 5-Fluor-uracil zu erkennen. Das bedeutet, daß 5-Fluor-uracil die Mitosen in keiner bestimmten Mitosephase hemmt. Wie GANZER und NITZE (20, 21) beschrieben haben, liegt der Angriffspunkt von 5-Fluor-uracil während der Interkinese.

3c. Differenzierung

Eine Beeinflussung der Reifung ist im Gegensatz zu anderen Cytostatika in unseren Versuchen nur gering (Abb. 6). In der Granulopoese findet sich in den Reifungskurven nach 48h eine vorübergehende Reifungsförderung. Sie kann allerdings durch die Regenerationshemmung vorgetäuscht sein, da sich die teilungsfähigen Granuloblasten weniger vermehrt haben. Nach 72h sind die Granulocyten sogar vermindert, so daß nun sicher eine Reifungshemmung durch 5-Fluor-uracil vorliegt.

3d. Proliferationskinetik

In der Granulopoese besteht also nach 24h und 48h eine Regenerationshemmung, jedoch ist die Proliferationshemmung erst nach 72h durch das gleichzeitige Vorliegen einer Reifungshemmung deutlich ausgeprägt.

4. Wirkung auf die Erythropoese

4a. Regeneration

Die Regeneration der Erythropoese ist viel weniger beeinträchtigt als die der Granulopoese.

4b. Mitoseablauf

Die caryologische Kurve (Abb. 10) zeigt bei nur wenig vorhandenen Mitosen für die Erythropoese kaum eine Abweichung zwischen 5-Fluor-uracil Zusatz und Kontrolle, was bedeutet, daß der Ablauf der Mitosen nicht durch das Cytostatikum beeinflusst wird.

4c. Differenzierung

Bei der Erythropoese liegt nur nach 24h eine mäßige Hemmung der Reifung (Abb. 9) vor, die aber durch einen erhöhten Erythropoietingehalt im Medium unterdrückt werden kann.

4d. Proliferationskinetik

Für die roten Zellen kann nach 24h eine signifikante Beeinträchtigung der Reifung durch den 5-Fluor-uracil Zusatz festgestellt werden. Die Regeneration ist zu dieser und den folgenden Versuchszeiten nicht beeinflusst. Deshalb ist die Proliferationshemmung im Vergleich zu derjenigen der Granulopoese eindeutig weniger ausgeprägt.

5. Wirkung auf die Lymphocyten

Die Lymphocyten (Abb. 11, 12) werden durch 5-Fluor-uracil nach 48h und 72h relativ vermindert. Das bestätigen die Ergebnisse von BOLLAG et al. an Stammzellen bei Knochenmarkuntersuchungen und REISMANN et al. im peripheren Blut von Versuchstieren.

6. Wirkung auf die Plasmazellen, 2-kernigen Zellen und Retikulumzellen

Angaben über die Plasmazellen (Abb. 15) und die zweikernigen Zellen (Abb. 16), die durch 5-Fluor-uracil nach 72h leicht ver-

mehrt sind, fehlen in der Literatur. Ebenso fehlen Beobachtungen über das Verhalten der Retikulumzellen.

In unseren Versuchen ist die Zahl der großen Retikulumzellen durch den Zusatz von 100 µg/ml 5-Fluor-uracil bis 48h leicht erniedrigt, nach 72h leicht erhöht (Abb.13).

Die phagocytierenden Retikulumzellen (Abb. 13) sind nach 48h und 72h vermindert und die kleinen Retikulumzellen (Abb. 13, 14) sind während der drei Versuchszeiten durch 5-Fluor-uracil Zusatz relativ vermehrt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchen die Wirkung von 5-FU an Knochenmarkkulturen in vitro und stellen die Beeinflussung der Zellproliferation durch das Cytostatikum mittels Reifungskurven und Mitoseindices bis zu drei Kulturtagen dar.

In der Konzentration von 100 µg/ml zeigt 5-FU in der Erythropoese nach 24h und 72h eine mäßige Beeinträchtigung der Regeneration und eine Reifungshemmung nach 24h.

In der Granulopoese bewirkt das Medikament eine signifikante Regenerationshemmung für alle drei Versuchszeiten neben einer Ausreifungsstörung nach 72h. Die Lymphocyten werden nach 48h und 72h relativ vermindert. Die Plasmazellen und die zweikernigen Zellen werden nach 72h vermehrt.

Die großen Retikulumzellen sind nach 48h erniedrigt, nach 72h erhöht, und die phagocytierenden Retikulumzellen sind nach 48h und 72h erniedrigt.

Die kleinen Retikulumzellen sind sowohl nach 24h und 48h als auch nach 72h relativ vermehrt.

VI. ABBILDUNGEN

Die Abbildungen 1 bis 7 stellen Reifungskurven dar. Dabei wird auf der Abszisse der prozentuale Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Erythropoese bzw. Granulopoese additiv aufgetragen. Auf der Ordinate wird die Zeit in Stunden (h) angegeben.

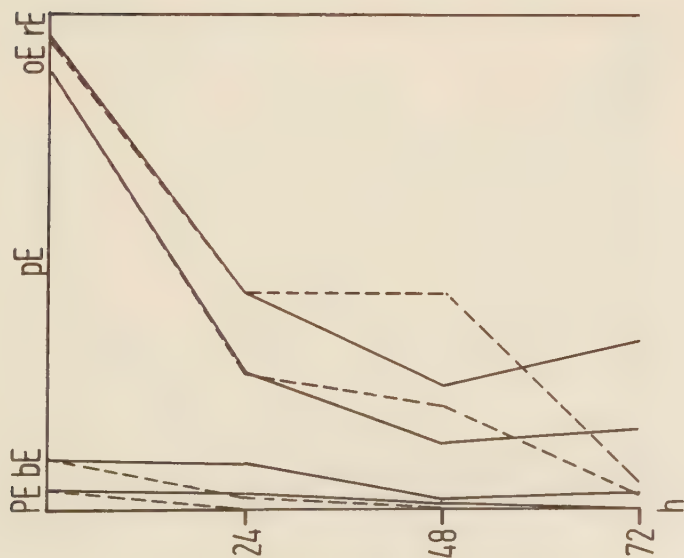
Dabei bedeuten:

————— Kontrollkulturen

----- Kulturen mit 5-FU Zusatz

In der caryologischen Kurve der Mitosephasenverteilung sind auf der Ordinate die verschiedenen Mitosephasen, auf der Abszisse ihr prozentualer Anteil dargestellt.

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE

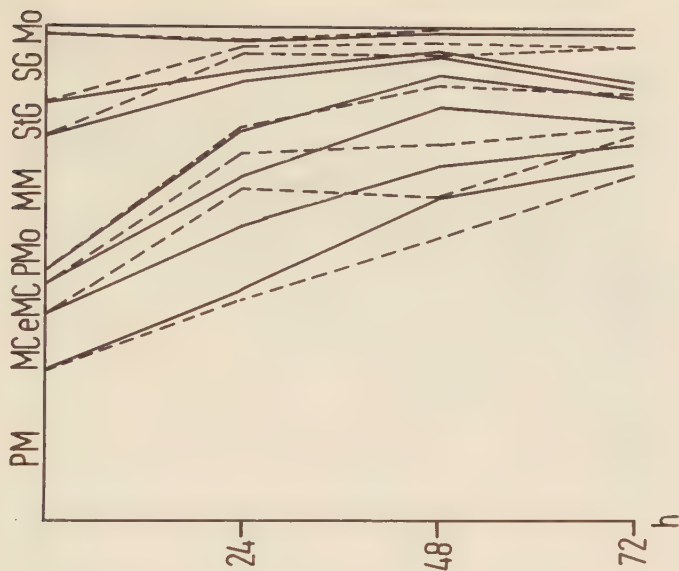
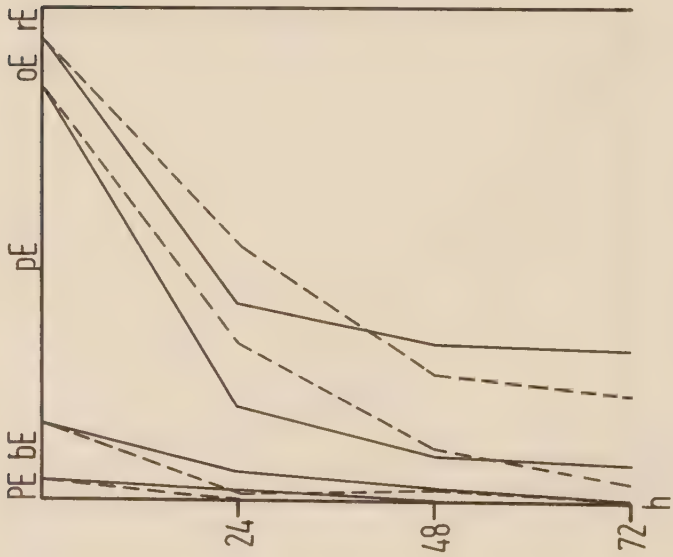


Abb.1 Reifungskurve des Versuchs I

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE

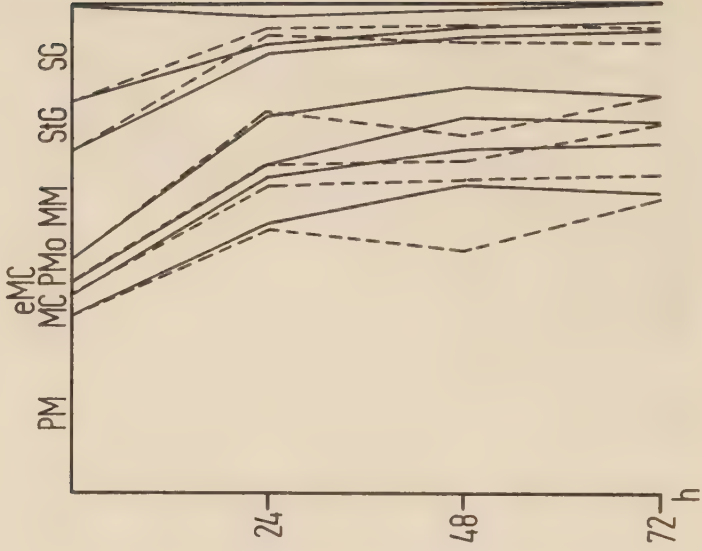


Abb.2 Reifungskurve des Versuchs II

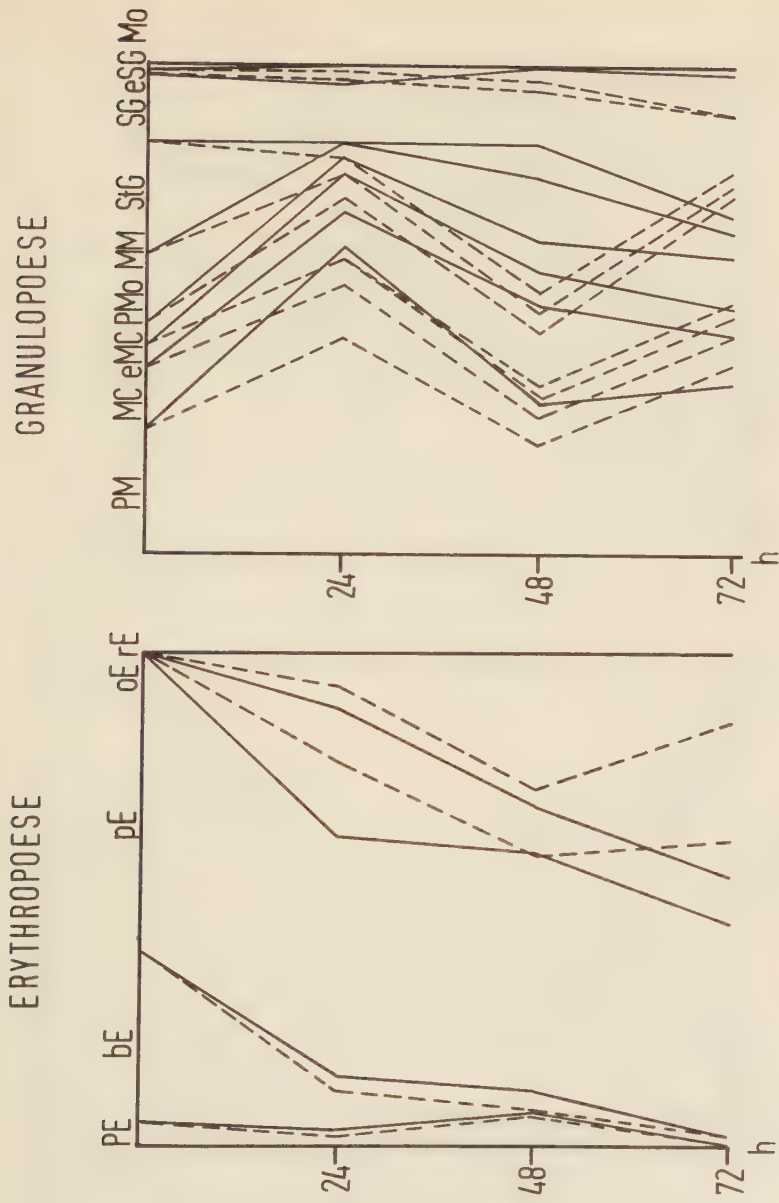


Abb.3 Reifungskurve des Versuchs III

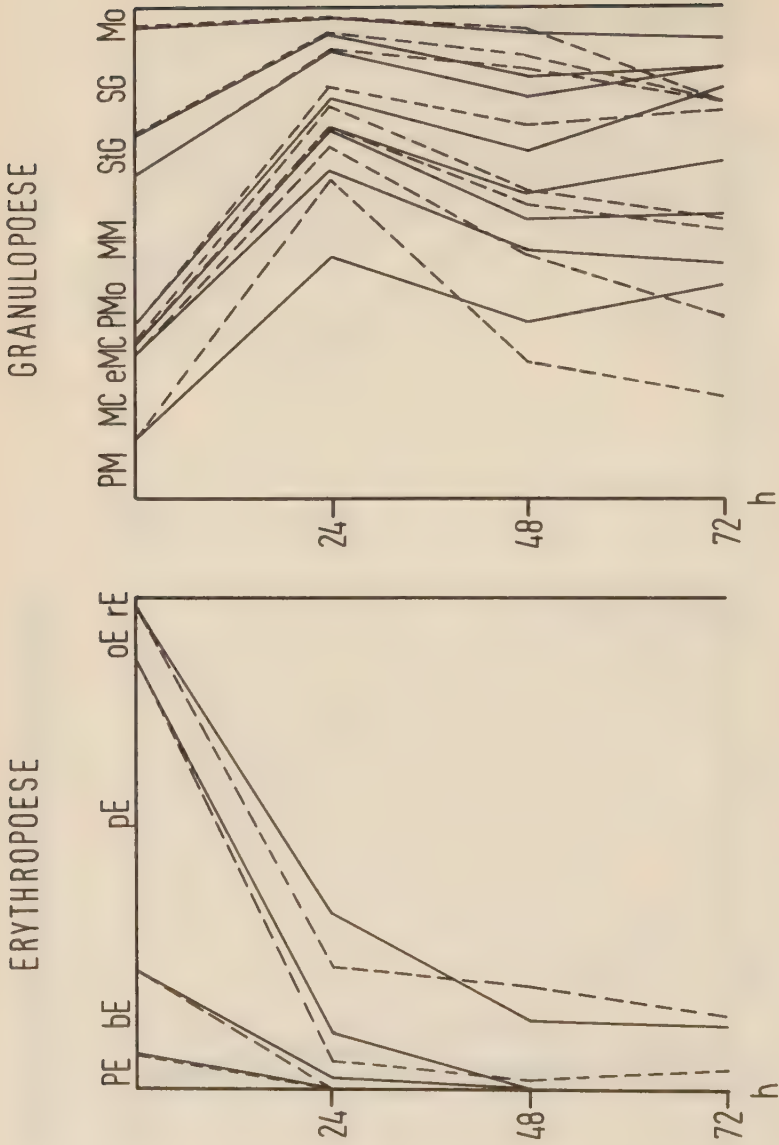


Abb. 4 Reifungskurve des Versuchs IV

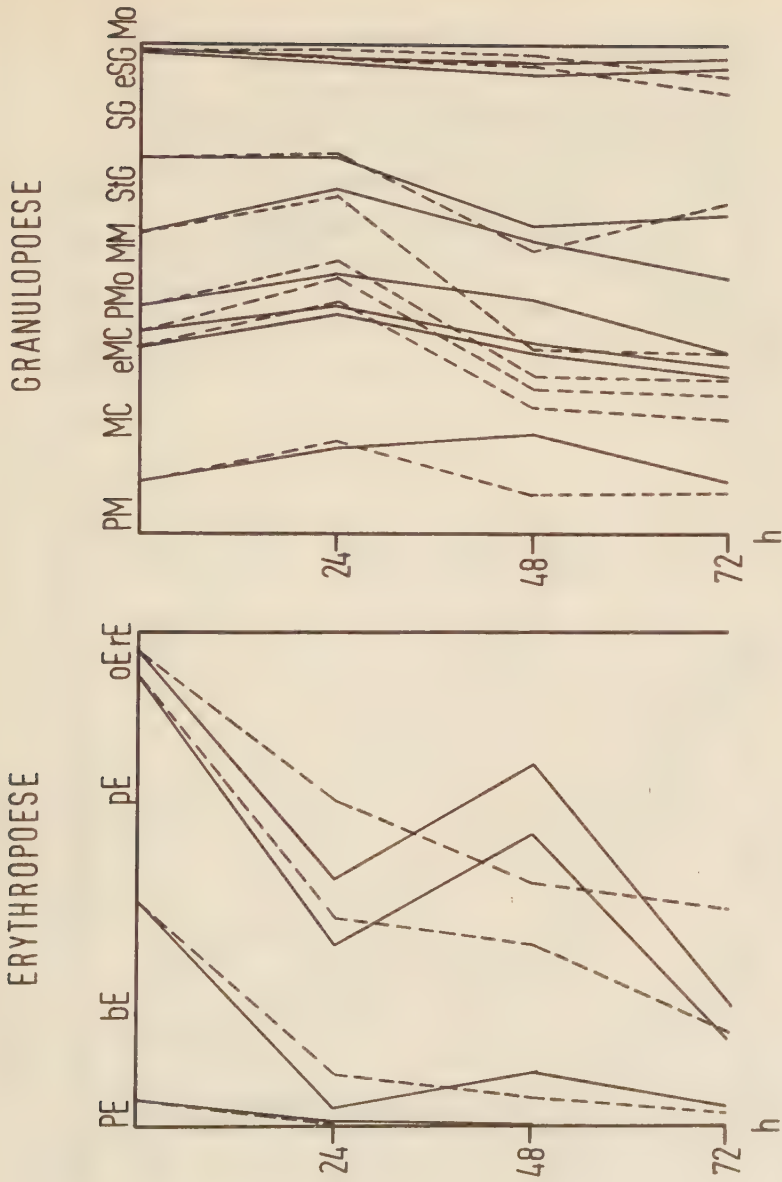
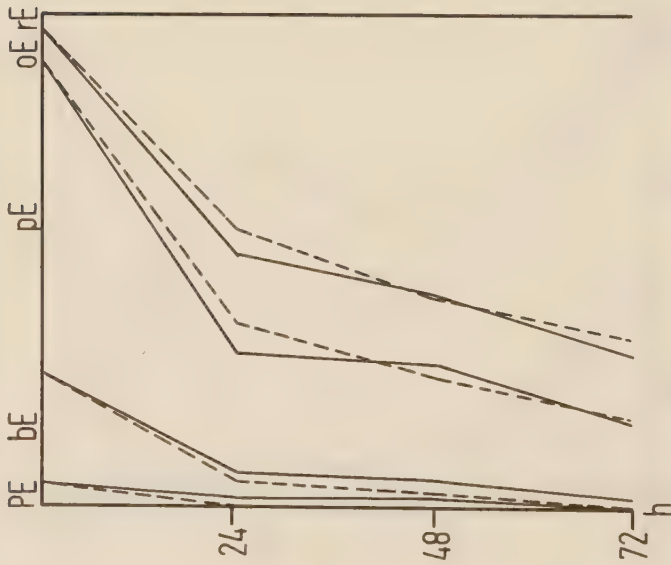


Abb. 5 Reifungskurve des Versuchs V

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE

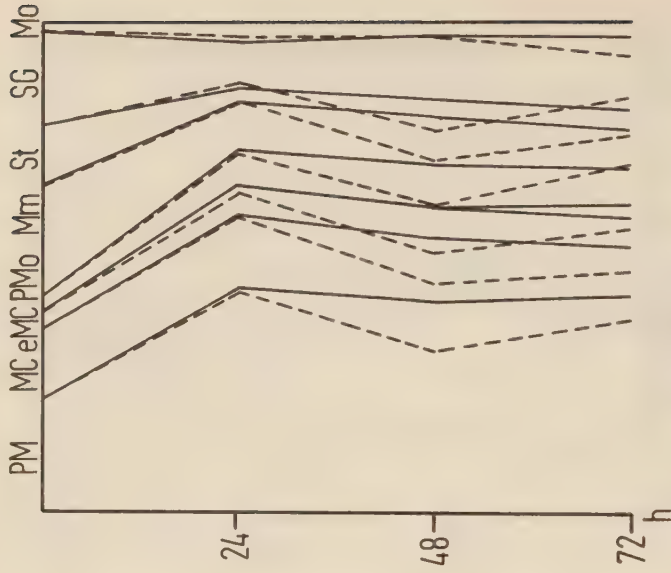


Abb. 6 Mittelwertkurve aus den Reifungskurven der Versuche I bis V

— Kontrolle ---- Zusatz

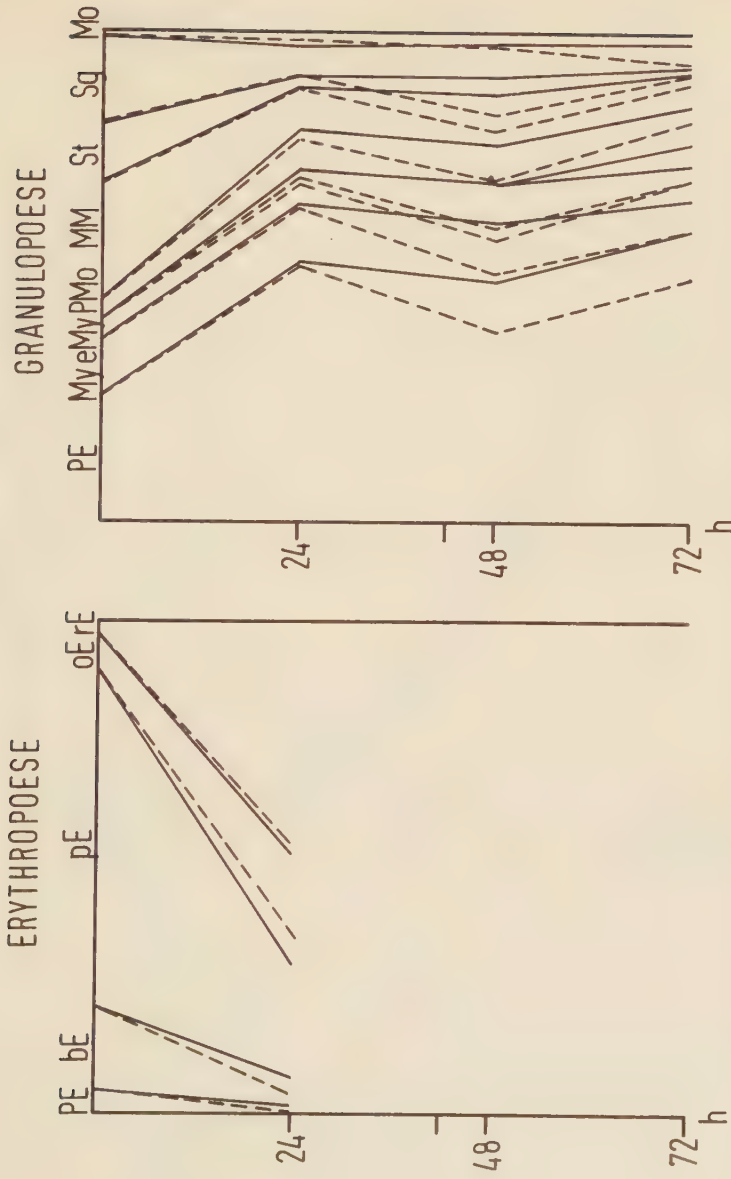


Abb. 7 Mittelwertkurve der Reifungskurven aus den Versuchen I bis IV

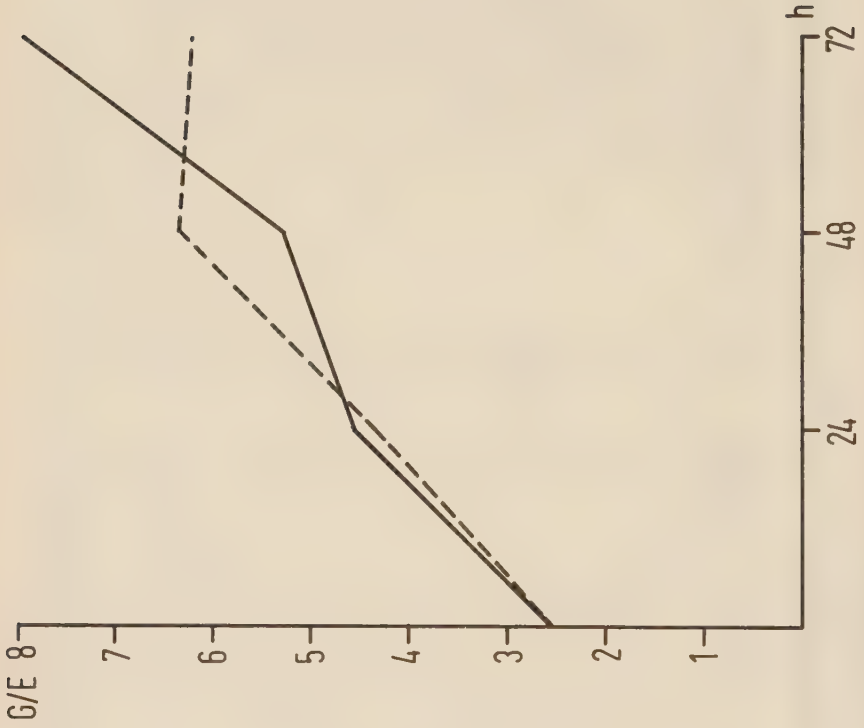
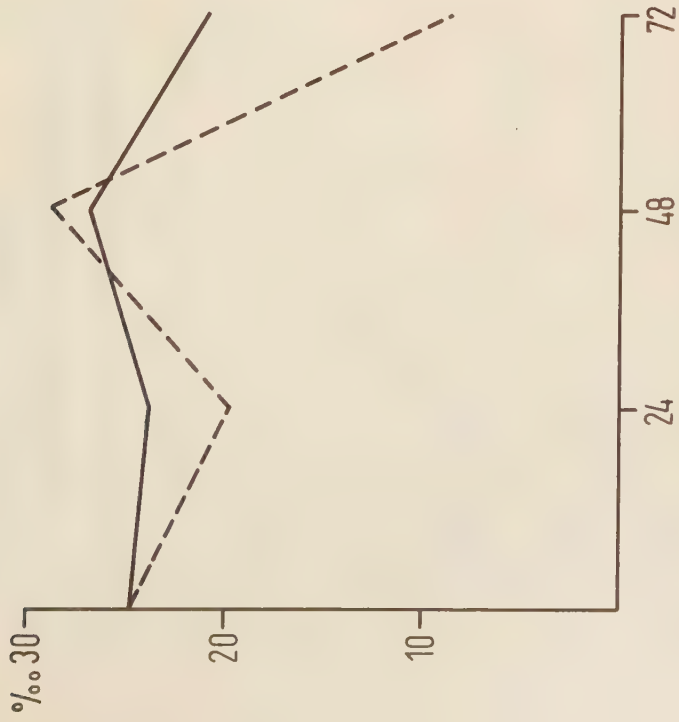


Abb. 8 Mittelwertkurve der G/E - Indices aus den Versuchen I bis V

ERYTHROPOESE

‰



GRANULOPOESE

‰

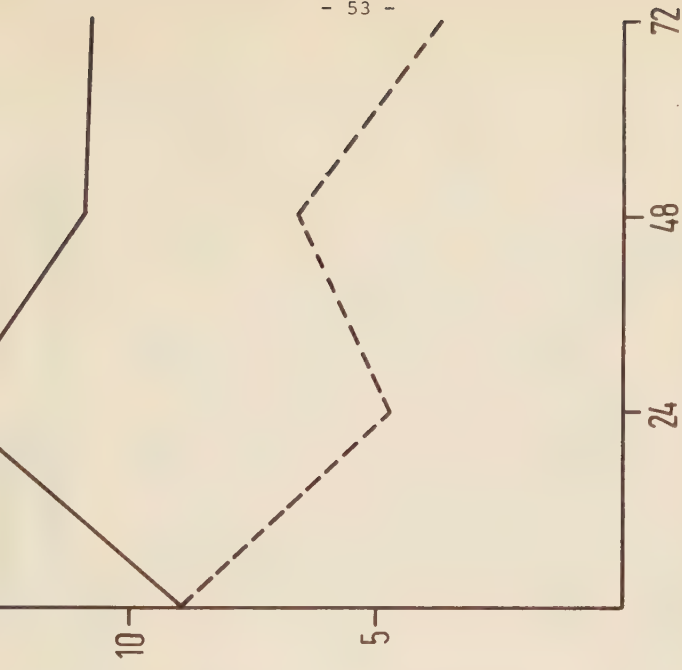
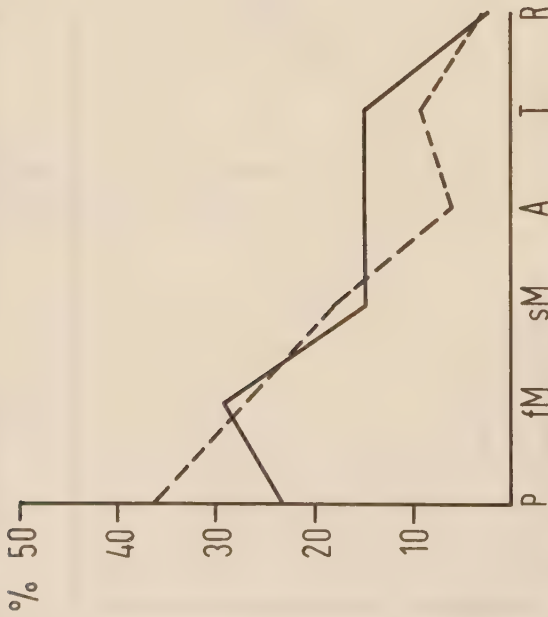


Abb.9 Mittelwertkurven der Mitoseindices aus den Versuchen I bis V in ‰

— Kontrollen - - - - 100 µg 5-FU

ERYTHROPOESE



GRANULOZYTPOESE

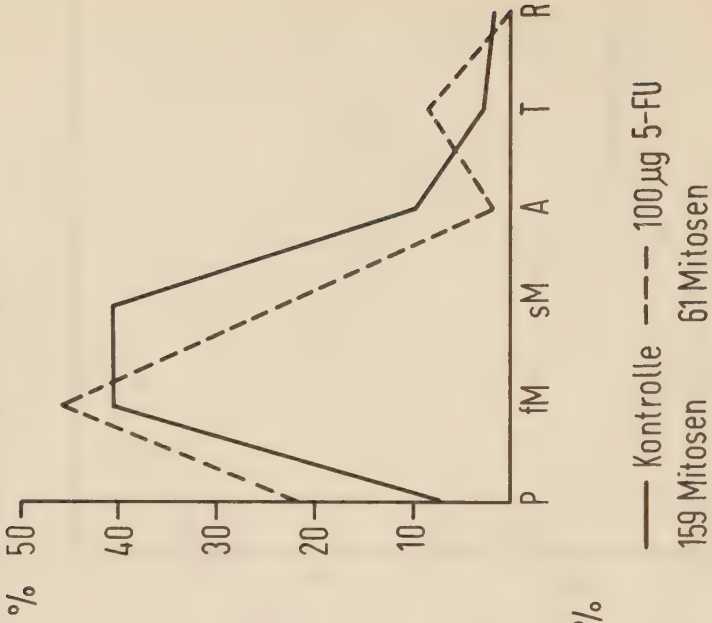


Abb.10 Verteilung der Mitosephasen in %

— Kontrolle
47 Mitosen

--- 100 µg 5-FU
61 Mitosen

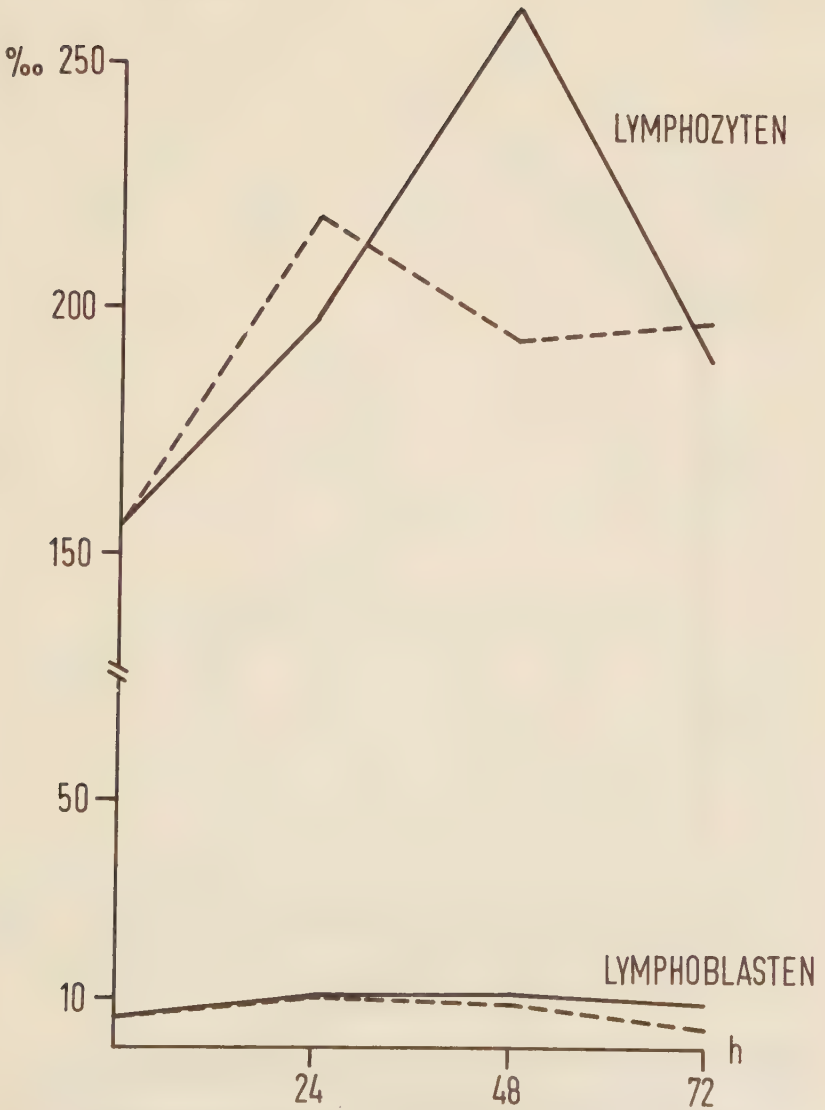


Abb.11 Mittelwertkurve der Lymphocytopoese aus den Versuchen I bis V in %

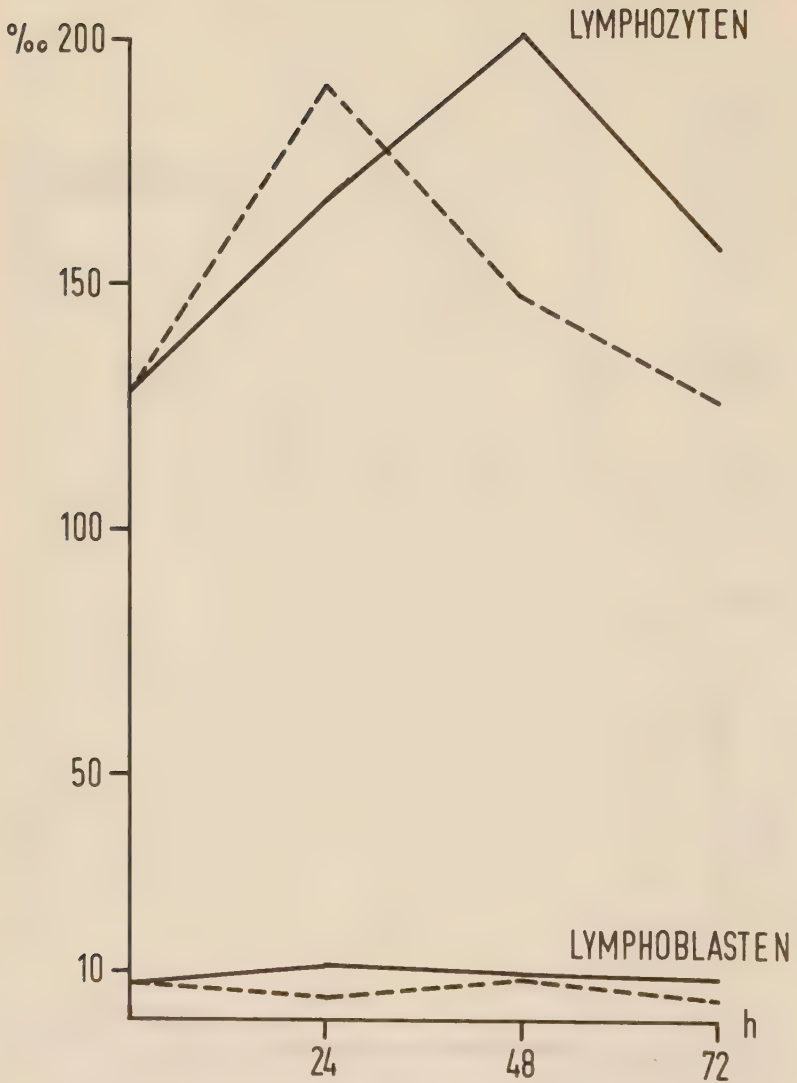
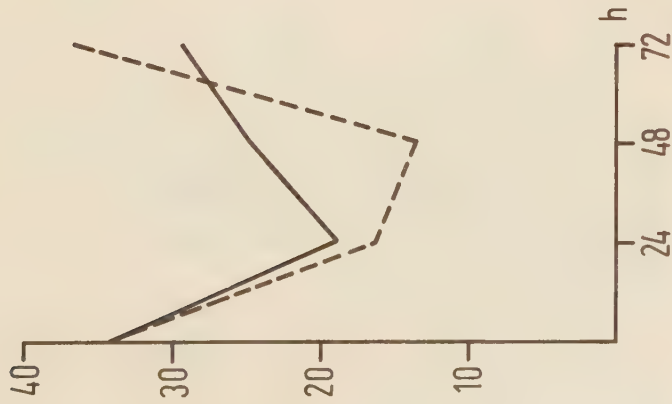
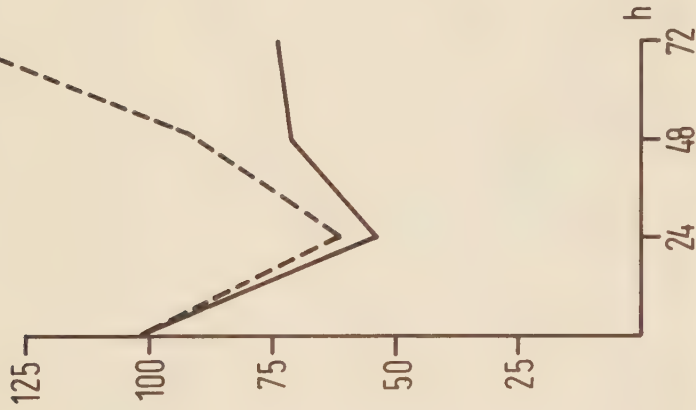


Abb.12 Mittelwertkurve der Lymphocytopoese aus den Versuchen I,II,IV und V in ‰

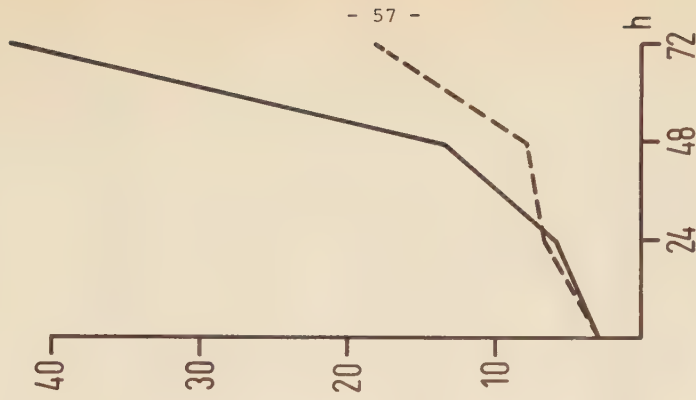
große R.



kleine R.



phagozytierende R.



- 57 -

Abb. 13 Mittelwertkurven der Retikulumzellen aus den Versuchen I bis V in ‰

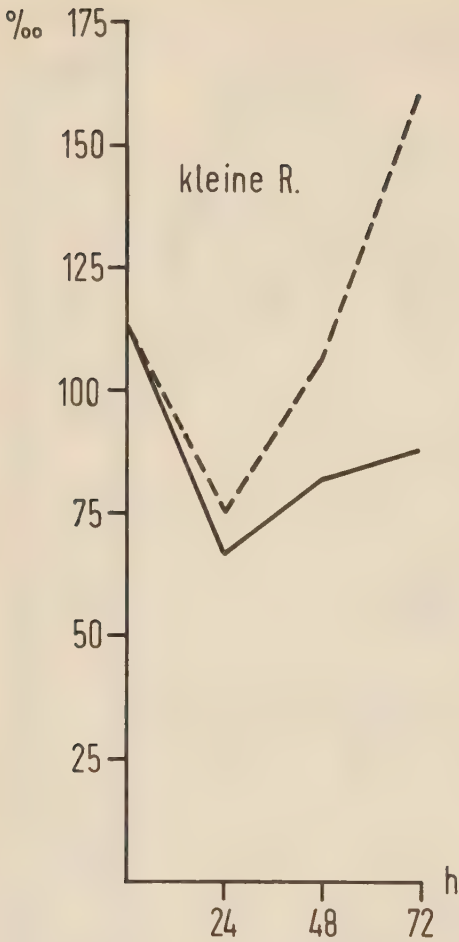


Abb.14 Mittelwertkurve der kleinen Retikulumzellen aus den Versuchen I, II, IV und V in ‰

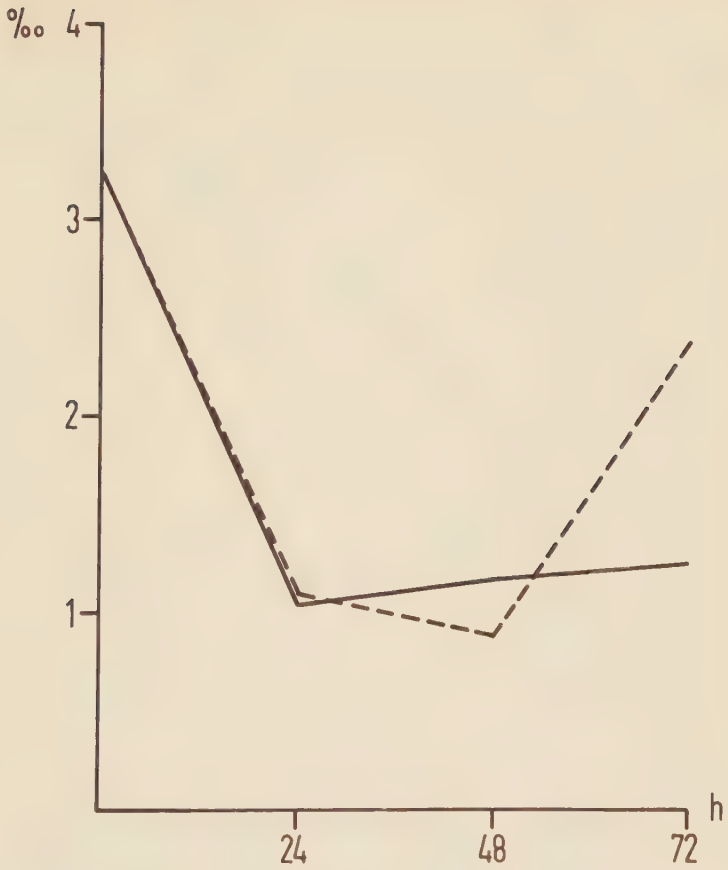


Abb.15 Mittelwertkurven der Plasmazellen aus den Versuchen I bis V in ‰

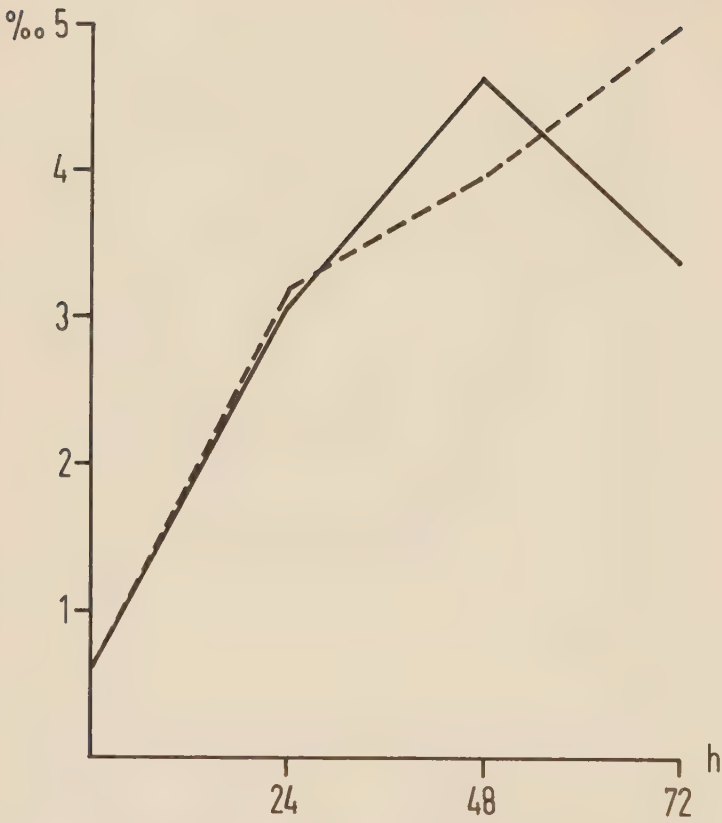


Abb.16 Mittelwertkurve der 2-kernigen Zellen aus den Versuchen I bis V in ‰.

ERYTHROPOESE

GRANULOPOESE

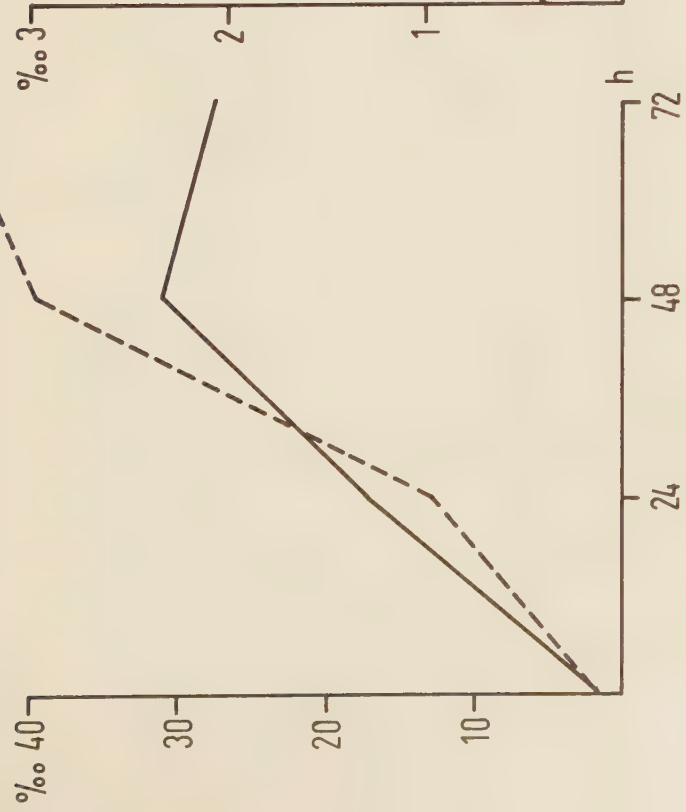


Abb. 17 Mittelwertkurve der 2-kernigen Zellen der Erythropoese und Granulopoese aus den Versuchen I bis V in %

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) AHMANN, D.L., BISEL, H.F., HAHN, R.G.:
An evaluation of 5-fluorouracil in the treatment
of advanced breast cancer.
Mayo Clin. Proc. 42, 193-199 (1967).
- (2) ALDRICH, J.T., STEVENS, L.C.:
Effect of 5-fluorouracil on early teratomas in mice.
Cancer Res. 27, 945-949 (1967).
- (3) ANSFIELD, F.J., CURRERI, A.R.:
Further clinical studies with 5-fluorouracil.
J. nat. Cancer Inst. 22, 497-505 (1959).
- (4) ANSFIELD, F.J.:
A less toxic fluorouracil dosage schedule.
J. Amer. med. Ass. 190, 686-688 (1964).
- (5) ANSFIELD, F.J., SCHROEDER, J.M., CURRERI, A.R.:
Five years clinical experience with 5-fluoro-
uracil.
J. Amer. med. Ass. 181, 295-299 (1962).
- (6) BELITZ, H.-I.:
Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
Ernst Klett Verlag, Stuttgart, Heft 3, 60 (1960).
- (7) BERGER, C.A., WITKUS, E.R.:
Cytological effects of 5-fluorouracil.
Exp. Cell Res. 27, 346-350 (1962).

- (8) BOECKL, O., HELL, E.:

Zur Behandlung fortgeschrittener Tumoren mit
Natulan-Stoßtherapie und 5-Fluor-uracil; in:
5th International Congress of Chemotherapy,
Proceedings, II/2, Antiviral Agents, Chemotherapy
of Mycoses, Chemotherapy of Malignant Neoplasias,
411-414. Ed. K.H. Spitzzy, H. Haschek. Wien:
Wiener medizinische Akademie (1967).

- (9) BOLL, I.:

Granulopoese unter physiologischen und patholo-
gischen Bedingungen.
Springer Verlag, Heidelberg (1966).

- (10) BOLLAG, W.:

Tierexperimentelle Untersuchungen mit dem
Cytostaticum 5-Fluorouracil.
Schweiz. med. Wschr. 87, 817-820 (1957).

- (11) BOSCH, L., HARBERS, E., HEIDELBERGER, C.:

Studies on fluorinated pyrimidines.
V. Effects on nucleic acid metabolism in vivo.
Cancer Res. 18, 335-343 (1958).

- (12) BRENNAN, M.J., TALLEY, R.W., SAN DIEGO, E.L., BURROWS,
J.H., O'BRYAN, R.M., VAITCEVITIUS, V.K., HOREGLAD, S.:

Critical analysis of 594 cancer patients treated
with 5-fluorouracil; in: Chemotherapy of Cancer,
118-150. Ed. P.A. Plattner. Amsterdam, London, New
York: Elsevier (1964).

- (13) BRULÉ, G.:

Combination treatment; in: Chemotherapy of
Cancer, 245-250. Ed. Pl. A. Plattner.
Amsterdam, London, New York: Elsevier (1964).

- (14) CARR, DAVID T., MD. DONALD S. CHILDS, JR., MD,
ROBERT E. LEE, MD.:

Radiotherapy plus 5-FU compared to radiotherapy
alone for inoperable and unresectable broncho-
genic carcinoma.
Cancer 29, 2, 375 (1972).

- (15) DANNEBERG, P.B., MONTAG, B., HEIDELBERGER, C.:

Studies on fluorinated pyrimidines.
IV. Effects on nucleic acid metabolism in vivo.
Cancer Res. 18, 329-334 (1958).

- (16) DECKER, D.G., MALKASIAN, G.D., MUSSEY, E., JOHNSON, C.E.:

Cyclophosphamide. Evaluation in recurrent and
progressive ovarian cancer.
Amer. J. Obstet. Gynec. 97, 656-663 (1967).

- (17) DEREN, T.L., WILSON, W.L.:

Use of 5-Fluorouracil in treatment of bladder
carcinomas.
J. urol. (Baltimore) 83, 390-393 (1960).

- (18) FALKSON, G., FICHARDT, T.:

Combined cancer chemotherapy and radiotherapy
in the treatment of human cancer.
S. Afr. J. Radiol. 3, 25-30 (1965).

- (19) FALKSON, G., SANDISON, A.G., JACOBS, E.L., FICHARDT, T.:
Combined telecobalt and 5-fluorouracil therapy
in cancer of the stomach.
S. Afr. med. J. 37, 712-717 (1963).
- (20) GANZER, U., NITZE, H.R.:
Mitoseindexbestimmung an in vivo synchronisier-
ten menschlichen Tumorgewebe.
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 194,
388-391 (1969).
- (21) GANZER, U., NITZE, H.R.:
Die Röntgenbestrahlung synchronisierter Tiertu-
moren.
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk. Heilk. 196,
Heft 2, 1970. Kongreßbericht 1970 (Travemünde),
Teil II, 398-400.
- (22) GLENN, J. F., HUNT, L.D., LATHEM, J.E.:
Chemotherapy of bladder carcinoma with 5-fluorou-
racil.
Cancer Chemother. Rep. 27, 67-69 (1963).
- (23) GOLLIN, F.F., ANSFIELD, F.J., VERMUND, H.:
Continued studies of combined chemotherapy and
irradiation in inoperable bronchogenic carcinoma.
Cancer Chemother. Rep. 51, 189-192 (1967)
- (24) HARBERS, E.:
Symposium über die Wirkung von Pharmaka auf die
Nukleinsäuren und ihr Stoffwechselverhalten. Die
Funktion der Nukleinsäuren im Zellstoffwechsel.
Wirkungsweise von Nukleinsäurebasenanalogen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 253,
99-116 (1966)

- (25) HART, G.D.:

Palliativ management of gastrointestinal cancer.
Canad. med. Ass. J. 90, 1265-1268 (1964).

- (26) HEIDELBERGER, C.:

Biochemistry of 5-fluorouracil; in: Chemotherapy
of Cancer, 88-98. Ed. Pl. A. Plattner. Amsterdam,
London, New York: Elsevier (1964).

- (27) HEIDELBERGER, C., ANSFIELD, F.J.:

Experimental and clinical use of fluorinated pyri-
midines in cancer chemotherapy.
Cancer Res. 23, 1226-1243 (1963).

- (28) HEIDELBERGER, C., CHAUDHURI, N.K., DANNEBERG, P.,
MOOREN, D., GRIESBACH, L., DUSCHINSKY, R., SCHNITZER,
R.J., PLEVEN, E., SCHEINER, J.:

Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-
inhibitory compounds.
Nature (London) 179, 663-666 (1957).

- (29) HEIDELBERGER, C., GRIESBACH, L., CRUZ, O., SCHNITZER,
R.J., GRUNBERG, E.:

Fluorinated pyrimidines. VI. Effects of 5-fluoro-
uridine and 5-fluoro-2-deoxyuridine on transplan-
ted tumours.
Proc. Soc. exp. Biol. et Med. (N.Y.) 97,
470-475 (1958).

- (30) HEIDELBERGER, C.: GRIESBACH, L., MONTAG, B.J., MOOREN,
D., CRUZ, O., SCHNITZER, R.J., GRUNBERG, E.:

Studies on fluorinated pyrimidines. II. Effects
on transplanted tumors.
Cancer Res. 18, 305-317 (1958).

- (31) HORTON, J., OLSON, K.B., GEHRT, P., SPEAR, M.:
Combination therapy with 5-fluorouracil, NSC-19893, Mitomycin C, NSC-26980, Vincristine, NSC-67574, and Thio TEPA, NSC-6396, for advanced cancer.
Cancer Chemother. Rep. 49, 59-61 (1965).
- (32) KOVEN, B.J.:
The role of chemotherapeutic agents in the management of gastric malignancy.
J. med. Soc. (N.J.) 61, 139 (1964).
- (33) LANGDON, E.A., OTTOMAN, R.E., ROCHLIN, D.B., SMART, C.R.:
Early results of combined radiation and chemotherapy in the treatment of malignant tumors.
Radiology 81, 1008-1013 (1963).
- (34) LUTZIGER, H., BERGER, M.:
Zur Behandlung von fortgeschrittenen gynäkologischen Karzinomen mit 5-Fluoro-uracil.
Gynaecologia (Basel) 161, 164-171 (1966).
- (35) MALKASIAN, G.D., DECKER, D.G., MUSSEY, E., JOHNSON, C.E.:
Preliminary observations on carcinoma of the cervix treated with 5-fluorouracil.
Amer. J. Obstet. Gynec. 88, 82-85 (1964).
- (36) MARTZ, G.:
Therapie des metastasierenden Mamma-Carcinoms.
Schweiz. med. Wschr. 96, 638-639 (1966).

- (37) MOERTEL, C.G., REITEMEIER, R.J.:
Experience with 5-fluorouracil in the palliative management of advanced carcinoma of the gastrointestinal tract.
Proc. Mayo Clin. 37, 520-529 (1962).
- (38) MOERTEL, C.G., REITEMEIER, R.J.:
Chemotherapy of gastrointestinal cancer.
Surg. Clin. N. Amer. 47, 929-953 (1967).
- (39) NITZE, H.R., GANZER, U. und K.-H. VOSTEEN:
Die Strahlenbehandlung synchronisierter Tumoren; erste Ergebnisse.
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk.Heilk. 196, Heft 2, 1970. Kongreßbericht 1970 (Travemünde), Teil II. Springer Verlag 1970, 401-404.
- (40) REGELSON, W.:
Chemotherapy of gastrointestinal cancer; in:
Cancer Chemotherapy, Basic and Clinical Applications. The 15th Hahnemann Symposium, 84-107.
Ed. I. Brodsky, B. Kahn, J.H. Moyer.
New York: Grune & Stratton (1967).
- (41) REISMANN, K.R., UDUPA, K.B., OKAMURA, H./USA, Kan., Kansas City:
Effects of endotoxin on normal and 5-fluorouracil suppressed hematopoietic stem cells.
J. Lab. Clin. Med. 76, 652-658 (1970).
- (42) ROCHLIN, D.B., SHINER, J., LANGDON, E., OTTOMAN, R.:
Use of fluorouracil in disseminated solid neoplasms.
Ann. Surg. 156, 105-113 (1962).

- (43) SCHELL, H.W., CRESSY, N.L.:
Clinical studies with 5-fluorouracil in 47
patients.
Amer. J. med. Sci. 244, 88-92 (1962).
- (44) SCHMIDT, C.G.:
Derzeitiger Stand und Wirkungsmechanismen der
Zytostatikabehandlung; in: Krebsforschung und
Krebsbekämpfung 9, 309-343. Ed. H.E. Bock,
U. Dold; München: Urban & Schwarzenbeck (1967).
- (45) SCHNEIDERMAN, M.A.:
The clinical excursion into 5-fluorouracil.
J. chron. Dis. 15, 283-295 (1962).
- (46) SEIDEL, H.I. und L.A. WEGNER:
Zur Sensibilitätsbestimmung von Tumoren in vitro.
Z. Krebsforschung 72, 105-118 (1969).
- (47) SILVA, A.R.M., SMART, C.R., ROCHLIN, D.B.:
Chemotherapy of breast cancer.
Surg. Gynec. Obstet. 121, 494-498 (1965).
- (48) SMITH, J.P., RUTLEDGE, F., BURNS, B.C., SOFFAR, S.:
Systemic chemotherapy for carcinoma of the cervix.
Amer. J. Obstet. Gynec. 97, 800-807 (1967).
- (49) SUHRLAND, L.G., WEISBERGER, A.A.:
"Intracavitäre" Applikation von 5-Fluoro-uracil
bei malignen Exsudaten.
Arch. intern. Med. 116, 431-433 (1965).

- (50) SULLIVAN, R.D.:
Chemotherapy of head and neck cancer by protracted
arterial infusion; in: Cancer of the head and neck,
615-625. Ed. J. Conley. Washington: Butterworth
(1967).
- (51) SULLIVAN, R.D., WATKINS, E., ZUREK, W.Z.:
Cancer chemotherapy by prolonged ambulatory arterial
infusion; in: 5th National Cancer Conference, Pro-
ceedings, 543-559. Philadelphia: Lippincott (1965).
- (52) VAITKEVICIUS, V.K., BRENNAN, M.J., BECKET, V.L.,
KELLY, J.E., TALLEY, R.W.:
Clinical evaluation of cancer chemotherapy with
5-fluorouracil.
Cancer 14, 131-152 (1961).
- (53) WEISS, A.J., JACKSON, L.:
The effect of 5-fluorouracil upon carcinomas of the
gastrointestinal tract and related organs.
Amer. J. Gastroent. 35, 138-146 (1961).
- (54) WILMANN, W. u. V. NEEF:
Die Thymidilatsynthetase in weißen Blutzellen und
im Knochenmark unter normalen und pathologischen
Bedingungen.
Klin. Wschr. 49, 755-762 (1971).
- (55) WILSON, W.L., BOTTIGLIERI, N.G.:
Carcinoma of the stomach: Treatment with 5-fluoro-
uracil.
West.Med. 4, 7-14 (1963).
- (56) WONG, T., BENSON, W.M.:
Toxicity of 5-fluorouracil.
Fed. Proc. 16, 348 (1957).

Frau Professor Dr. med. I. B o l l danke ich für
die Überlassung des Themas und ihre stets hilfreiche
Unterstützung bei der Auswertung meiner Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 23.3.1942 in Breslau geboren.

Von 1948-1956 Besuch der Grundschule in Ilmenau/Thüringen.

Von 1957-1963 Besuch der Friedrich von Bodelschwingh-Schule in Bielefeld. Reifeprüfung im Februar 1965 an dem Aufbau-gymnasium in Rüthen/Westf.

Im Sommer 1965 Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Freien Universität Berlin.

Zahnärztliche Vorprüfung im April 1968 und zahnärztliche Prüfung im März 1970.

Von Mai 1971 bis Oktober 1973 Assistent in einer Zahnarzt-praxis. Seit Oktober 1973 in eigener Praxis tätig.

